

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
Departamento de Cirugía



**TESIS DOCTORAL**

**Neurogénesis hipocampal adulta: papel en el deterioro  
cognitivo post-ictus y estrategias farmacológicas para su  
modulación**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Sergio Revuelta Suero**

**Directores**

**Francisco Javier Serrano Hernando**  
**Antonio José López Farré**  
**Guillermo Moñux Ducajú**

**Madrid, 2019**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



INDUCCIÓN DE CAMBIOS METABÓLICOS E INFLAMATORIOS  
EN AORTA SANA A PARTIR DE MEDIOS CONDICIONADOS  
DE PACIENTES CON ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL

TESIS DOCTORAL  
*SERGIO REVUELTA SUERO*

MADRID, 2018



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



INDUCCIÓN DE CAMBIOS METABÓLICOS E INFLAMATORIOS  
EN AORTA SANA A PARTIR DE MEDIOS CONDICIONADOS  
DE PACIENTES CON ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL

TESIS DOCTORAL

*SERGIO REVUELTA SUERO*

DIRECTORES DE TESIS

*FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO*

*ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ*

*GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ*

MADRID, 2018



**D. FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO, DOCTOR EN  
MEDICINA Y CIRUGÍA Y JEFE DE SERVICIO DE ANGIOLOGÍA Y  
CIRUGÍA VASCULAR DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE  
MADRID**

CERTIFICA:

Que Don Sergio Revuelta Suero ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada **“INDUCCIÓN DE CAMBIOS METABÓLICOS E INFLAMATORIOS EN AORTA SANA A PARTIR DE MEDIOS CONDICIONADOS DE PACIENTES CON ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL ”** con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en Madrid a 19 de Marzo de 2018.

D. Francisco Javier Serrano Hernando



D. **ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ**, DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y CODIRECTOR DEL AULA DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA Y CLÍNICA APLICADA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA:

Que Don Sergio Revuelta Suero ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada **“INDUCCIÓN DE CAMBIOS METABÓLICOS E INFLAMATORIOS EN AORTA SANA A PARTIR DE MEDIOS CONDICIONADOS DE PACIENTES CON ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL ”** con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en Madrid a 19 de Marzo de 2018.

D. Antonio José López Farré





**D. GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ**, DOCTOR EN MEDICINA Y  
CIRUGÍA Y MÉDICO ADJUNTO DEL SERVICIO DE ANGIOLOGÍA  
Y CIRUGÍA VASCULAR DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS  
DE MADRID

CERTIFICA:

Que Don Sergio Revuelta Suero ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada **“INDUCCIÓN DE CAMBIOS METABÓLICOS E INFLAMATORIOS EN AORTA SANA A PARTIR DE MEDIOS CONDICIONADOS DE PACIENTES CON ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL ”** con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en Madrid a 19 de Marzo de 2018.

D. Guillermo Moñux Ducajú



A MIS PADRES  
A MI HERMANA  
A PAPI



# AGRADECIMIENTOS



Son muchas las personas a las que tengo que agradecer el haber conseguido llevar a cabo esta ardua tarea, así que, empezaremos por el principio. Gracias a mi padre, por enseñarme y acercarme a esta profesión, y por inculcarme que no hay tarea imposible cuando de verdad te propones conseguir algo. Gracias a mi madre, por estar siempre ahí, y por enseñarme que la constancia, el esfuerzo e intentar dar en todo momento un poquito más, son virtudes que siempre dan sus frutos. A mi hermana, por su apoyo siempre, cuando todo va bien y cuando todo fue difícil, y por supuesto, por enseñarme a leer, sin lo que se me antoja imposible haber podido siquiera comenzar esta Tesis.

Quiero agradecer a todos mis compañeros del Hospital Clínico San Carlos esos maravillosos cinco años que compartí con ellos y que nunca olvidaré, pues ahí aprendí todo lo necesario para comenzar una nueva etapa trabajando lejos de lo que siempre será mi casa. Especial agradecimiento a Javier Serrano, el "jefe", un ejemplo a seguir como cirujano, como médico, como docente, y como persona; a Isaac, amigo, maestro y compañero, pues si no me hubieras exigido lo que yo consideraba imposible, nunca lo hubiera alcanzado; algo que, aunque haya pasado tiempo desde que nos conocemos, sigues consiguiendo. Por supuesto, a todos los residentes con los que compartí esta etapa tan importante, especialmente a Manuela, con quien conviví en esos momentos difíciles durante nuestros comienzos en esta profesión, siendo un apoyo y una motivación para mí, y actualmente una amiga para toda la vida que gané durante la residencia. Tampoco quisiera olvidar al equipo de enfermería, auxiliares, celadores, y resto de personal que tanto me enseñaron y ayudaron.

Gracias a Wili, por su apoyo durante toda la realización de esta Tesis, y por su dirección, y al Dr. López Farré, por su inestimable ayuda y su accesibilidad para asaltarle con mis dudas. Muchas gracias a José Zamorano, por su apoyo en el laboratorio, su paciencia y por toda la ayuda que me ha dedicado para la realización de la presente Tesis. Como no, gracias también a Begoña pues ha hecho tan fácil todo lo que ha mi se me hacía un mundo.

También quiero agradecer a todos mis maestros y profesores lo que me han enseñado a lo largo de la vida, pues todo ello cuenta y ha sumado en esta Tesis.

Por último, y no por ello menos importante, muchas gracias, Mamen, porque sin tí también hubiera sido imposible, por tu apoyo diario, por aguantarme y ayudarme en los momentos malos, y por compartir conmigo tu vida, lo que hace mucho más divertida la mía.

Madrid, 13 de marzo de 2018.





# ACRÓNIMOS



AAA: Aneurisma de aorta abdominal.

ACD: Ácido citrato dextrosa.

Acetil-CoA: Acetil-coenzima A.

ADP: Adenosin difosfato.

AEF: Análisis de elementos finitos.

ARM: Angio resonancia magnética.

ATP: Adenosin trifosfato.

BCA: Ácido bicinconínico.

CE: Células endoteliales.

CML: Células musculares lisas.

CPMN: Células polimorfonucleares.

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato.

EA: Ecografía abdominal.

ELISA: Del inglés *enzyme linked immunosorbent assay* (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas).

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

EVAR: Del inglés *endovascular aortic repair* (reparación endovascular de la aorta).

FvW: Factor von Willebrand.

GP: Glicoproteínas.

G3P: Gliceraldehído-3-fosfato.

G6P: Glucosa-6-fosfato.

HIF: Del inglés *hipoxia inducible factor* (factor inducible por hipoxia).

IFN- $\gamma$ : Interferón- $\gamma$ .

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LEI: Lámina elástica interna.

MC: Medio condicionado.

MC-AAA: Medio condicionado por tejido de aorta aneurismática.

MC-M: Medio condicionado por células mononucleares.

MC-P: Medio condicionado por plaquetas.

MDH: Malato deshidrogenasa.

MEC: Matriz extracelular.

MMP: Metaloproteinasas.

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NO: Oxído nítrico.

PCR: Proteína C reactiva.

PDGF: Del inglés *platelet derived growing factor* (factor de crecimiento derivado de plaquetas).

PDH: Piruvato deshidrogenasa.

PRCM: Plasma rico en células mononucleares.

PRP: Plasma rico en plaquetas.

PVDF: Del inglés *polyvinylidene fluoride* (polifloruro de vinilidieno).

P4H: Prolil-4-hidroxilasa.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

SDS: Del inglés *sodium dodecyl sulfate* (dodecilsulfato sódico).

TC: Tomografía computerizada.

TIL: Trombo intraluminal.

TIMP: Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas.

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral.

WB: Western Blot.





# ÍNDICE





<b>I</b>	<b>Resumen/Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>1.</b>	<b>Aneurismas de aorta abdominal.....</b>	<b>13</b>
II.1.1	Definición de aneurisma de aorta abdominal.....	13
II.1.2	Epidemiología .....	13
II.1.3	Etiología.....	15
II.1.3.a	Estructura y fisiología de la pared aórtica sana.....	16
II.1.3.b	La pared de los AAA .....	20
II.1.3.c	Factores mecánicos y hemodinámicos de la pared vascular y su implicación en los AAA.....	21
II.1.3.d	Teorías etiopatogénicas de los AAA.....	24
II.1.4	Clínica.....	35
II.1.4.a	AAA sin rotura.....	35
II.1.4.b	AAA roto .....	35
II.1.5	Historia Natural de los AAA.....	36
II.1.6	Diagnóstico .....	38
II.1.6.a	Ecografía abdominal (EA) .....	38
II.1.6.b	Tomografía computerizada (TC).....	39
II.1.6.c	Resonancia magnética nuclear (RMN).....	40
II.1.6.d	Arteriografía.....	40
II.1.7	Tratamiento .....	40
<b>2.</b>	<b>Elementos celulares sanguíneos relacionados con la inflamación en los AAA .....</b>	<b>42</b>
II.2.1	Plaquetas .....	42
II.2.1.a	Estructura de las plaquetas .....	43
II.2.1.b	Fisiología de las plaquetas .....	44
II.2.1.c	Implicación de las plaquetas en los procesos inflamatorios.....	45
II.2.1.d	Interacción de la plaqueta con distintos tipos celulares .....	46
II.2.2	Células mononucleares .....	48
II.2.2.a	Clasificación y funciones de las células mononucleares .....	49
II.2.2.b	Activación linfocitaria y tipos de respuesta inmune.....	51
<b>3.</b>	<b>Metabolismo Energético Celular .....</b>	<b>53</b>

II.3.1 Glucolisis. Formación de piruvato .....	54
II.3.2 Destinos metabólicos del piruvato.....	55
II.3.3 Vía metabólica aerobia. Metabolismo oxidativo: respiración.....	56
II.3.3.a Transformación del piruvato en acetil-coA .....	57
II.3.3.b Ciclo del ácido cítrico / Ciclo tricarboxílico / Ciclo de Krebs .....	57
II.3.3.c Transporte electrónico y fosforilación oxidativa.....	60
II.3.4 Vía metabólica anaerobia. Metabolismo del lactato.....	61
<b>4. Cultivos en medios condicionados.....</b>	<b>62</b>
II.4.1 Uso de cultivos en medios condicionados para el estudio de los AAA.....	63
<b>III HIPÓTESIS .....</b>	<b>67</b>
<b>IV OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
<b>V MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>77</b>
<b>1. Recogida y preparación de las muestras de aorta, plaquetas y células mononucleares .....</b>	<b>79</b>
<b>2. Generación de medios condicionados y cultivo de tejido aórtico .....</b>	<b>80</b>
V.2.1 Fundamentos de la técnica.....	80
V.2.2 Preparación de medios condicionados.....	81
V.2.2.a Material utilizado .....	81
V.2.2.b Preparación del Medio Condicionado por tejido de AAA (MC-AAA) .....	82
V.2.2.c Preparación del Medio Condicionado por plaquetas (MC-P) .....	82
V.2.2.d Preparación del Medio Condicionado por células mononucleares (MC-M) .....	83
V.2.3 Cultivos en medios condicionados .....	83
V.2.3.a Material utilizado .....	83
V.2.3.b Preparación de las muestras .....	84
<b>3. Análisis por Western Blot (WB).....</b>	<b>84</b>
V.3.1 Material utilizado .....	85
V.3.2 Preparación de las muestras .....	86
V.3.2.a Homogenización de las muestras.....	86
V.3.2.b Medida de proteínas. Método BCA .....	86
V.3.2.c Desnaturalización de las proteínas.....	87

V.3.3 Electroforesis en gel .....	88
V.3.4 Transferencia y bloqueo de proteínas .....	88
V.3.5 Marcaje de las proteínas .....	90
V.3.6 Análisis .....	90
<b>4. Análisis de actividad enzimática.....</b>	<b>90</b>
<b>5. Análisis por ELISA.....</b>	<b>91</b>
V.5.1 Fundamentos de la técnica .....	92
V.5.2 Material utilizado .....	93
V.5.3 Preparación de las muestras y análisis.....	93
<b>6. Determinación del contenido de piruvato y lactato .....</b>	<b>94</b>
V.6.1 Piruvato.....	94
V.6.2 Lactato .....	94
<b>7. Análisis estadístico.....</b>	<b>94</b>
<b>VI RESULTADOS .....</b>	<b>97</b>
<b>1. Descripción de la muestra.....</b>	<b>99</b>
<b>2. Análisis de moléculas inflamatorias.....</b>	<b>100</b>
<b>3. Análisis de MMP-9 .....</b>	<b>102</b>
<b>4. Análisis de metabolismo energético.....</b>	<b>103</b>
VI.4.1 Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) .....	103
VI.4.2 Expresión de malato deshidrogenasa (MDH) .....	104
VI.4.3 Contenido de piruvato y lactato .....	105
<b>VII DISCUSIÓN.....</b>	<b>109</b>
Limitaciones del estudio .....	120
<b>VIII CONCLUSIONES .....</b>	<b>123</b>
<b>IX BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>129</b>



# I. RESUMEN/ABSTRACT



## **I RESUMEN**

### **INTRODUCCIÓN**

Los aneurismas de aorta abdominal (AAA) se definen como una dilatación localizada de la aorta del 150% de su diámetro normal. Su prevalencia es del 6% en varones, suponiendo la decimoséptima causa de muerte en varones mayores de 55 años.

En las últimas décadas se han esclarecido ciertos procesos que conducen a la dilatación arterial y finalmente a la rotura aórtica. Entre estos procesos cabe destacar la destrucción de la matriz extracelular y la apoptosis de células musculares lisas en el contexto de un proceso inflamatorio crónico, con incremento del estrés oxidativo. Asimismo, se han identificado varios grupos celulares que participan en dicho proceso inflamatorio (linfocitos T y B, macrófagos, plaquetas). Más recientemente se ha observado que existe un predominio del metabolismo anaerobio en el tejido aórtico aneurismático. A pesar de los avances realizados para la comprensión de su fisiopatología, existen todavía aspectos de la misma no explicados, entre ellos, la causa que inicia dichos procesos.

Los medios condicionados (MC) permiten exponer tejidos a sustancias desconocidas pero que pueden tener un efecto biológico en dichos tejidos, que puede ser estudiado. Es una herramienta útil para conocer qué grupos celulares son responsables de un proceso fisiopatológico cuyo mecanismo no es bien conocido.

Mediante la exposición de aorta sana a distintos MC por grupos celulares de pacientes con AAA se pretenden inducir cambios inflamatorios y metabólicos característicos de esta patología, con el fin de conocer cuál de estos grupos celulares es el responsable del inicio de los procesos fisiopatológicos de los AAA.



## RESUMEN/ABSTRACT

Los objetivos del presente estudio son analizar el efecto de los MC de tejido aneurismático (MC-AAA), plaquetas (MC-P) y células mononucleares (MC-M) sobre el tejido aórtico sano, en cuanto a marcadores inflamatorios, producción de metaloproteinasas, estado de estrés oxidativo y metabolismo.

### MATERIAL Y MÉTODO

Se tomaron muestras de tejido de aorta aneurismática de pacientes con AAA durante la cirugía de reparación de los mismos, así como sangre periférica de la que se obtuvieron plaquetas y células mononucleares. Se cultivaron los tres tejidos en medio RPMI, retirando posteriormente el tejido y obteniendo tres MC: MC-AAA, MC-P y MC-M. Asimismo se obtuvo tejido aórtico sano de pacientes donantes en parada cardiorrespiratoria, y se cultivó dicho tejido durante 48 horas en cada uno de los tres MC, además de en RPMI, utilizado como medio control.

Posteriormente se desechó el MC y se cuantificaron distintas moléculas y actividades enzimáticas en el tejido aórtico: IL-1 $\beta$ , IL-6 y CD40L mediante ELISA; *gp91phox*, MMP-9 y malato deshidrogenasa (MDH) mediante western blot (WB); actividad de lactato deshidrogenasa (LDH), actividad de MMP-9 y contenido de piruvato y lactato mediante kits comerciales.

Se compararon los resultados obtenidos en cada MC, con los obtenidos en el medio control.

### RESULTADOS

Se obtuvieron muestras de 6 pacientes con AAA para creación de MC y muestras de 6 aortas sanas para su cultivo en los mismos.

La expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 se vio incrementada por el MC-AAA y por el MC-M. El MC-P aumentó la expresión de IL-1 $\beta$  y de CD40L, esta última, no fue incrementada

## RESUMEN/ABSTRACT

por los otros dos MC. Se observó una tendencia a una mayor expresión de *gp91phox* en los 3 MC, especialmente marcada en el MC-P.

La actividad de MMP-9 se fue superior en los tejidos expuestos al MC-M, sin diferencias entre los otros dos MC y los controles. Sin embargo, la expresión de la misma fue inferior en los tres MC respecto al grupo control.

En cuanto al estudio del metabolismo, la actividad de LDH se vio reducida en los MC. Sin embargo, se observó una menor expresión de MDH en los tres MC, que en el caso del MC-AAA se asoció además a un mayor contenido de lactato. No se observaron diferencias en el contenido de piruvato entre los MC y el grupo control.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran una inducción de cambios inflamatorios característicos de los AAA producida por los 3 MC, aunque en el caso del MC-P la inflamación inducida es selectiva para marcadores de inflamación crónica. Asimismo, se ha observado inducción de otros procesos relacionados con la fisiopatología de los AAA como es el incremento del estrés oxidativo y modificaciones en la expresión de la MMP-9 y su actividad, que podrían reflejar cambios iniciales en dichos procesos fisiopatológicos.

El MC-AAA ha inducido además, de forma muy característica, los cambios metabólicos observados en tejido aneurismático, con un incremento del metabolismo anaerobio. Este cambio no es atribuible a condiciones de hipoxia que pueden existir *in vivo*, dado que en nuestro experimento no se daba dicha condición.

En global, el MC-AAA ha sido el que más específicamente ha reproducido los cambios observados en los AAA, lo que sugiere que el estímulo original que provoca los cambios fisiopatológicos característicos de los AAA se encuentra en la propia aorta.

## I ABSTRACT

### INTRODUCTION

Abdominal aortic aneurysms (AAA) are defined as a focal dilatation of the aorta of at least a 150% its normal diameter. In males, a prevalence of 6% has been estimated, and they are the 17<sup>th</sup> leading cause of death in men older than 55 years.

In the last decades knowledge about the processes that lead to arterial dilatation and rupture has increased. These processes include the destruction of extracellular matrix and smooth muscle cell apoptosis in the context of chronic inflammation and an increase in oxidative stress. Several cellular groups had been identified to participate in chronic inflammation (T and B lymphocytes, macrophages, platelets). Recently, an increase in anaerobic metabolism in aneurysmatic aortic tissue has been described. Despite the advances made to understand aneurysm physiopathology, there are still aspects of it that remain unexplained, among them, the cause that initiates these processes.

Conditioned media (CM) allow to expose tissues to unknown substances which may have a biologic effect in such tissues. This effect can be studied and measured. They are a useful tool to assess which cellular groups may be responsible for a physiopathologic process whose mechanism is scarce known.

By means of the exposure of healthy aorta to different CM (obtained from cellular groups of patients with AAA), it is intended to induce characteristic inflammatory and metabolic changes described in AAA, in order to know which of these cell groups is responsible for the initiation of pathophysiological processes of AAA.

The aim of the present study is to analyze the effect of CM of aneurysmal tissue (CM-AAA), platelets (CM-P) and mononuclear cells (CM-M) on healthy aortic tissue, in

terms of inflammatory markers, metalloproteinase production, oxidative stress state and metabolism.

### MATERIALS AND METHODS

AAA samples were obtained during elective open repair, as well as peripheral blood samples from which platelets and mononuclear cells were obtained. The three tissues were cultured in RPMI medium, and after incubation tissue was withdrawn to obtain three different CM: CM-AAA, CM-P and CM-M. Non-aneurysmal abdominal aortic samples were obtained from donor patients in cardiorespiratory arrest. These samples were cultured for 48 hours in the three CM as well as in RPMI used as a control medium.

CM was withdrawn, and different molecules and enzymatic activities were determined in the aortic tissue: IL-1 $\beta$ , IL-6 and CD40L by ELISA; *gp91phox*, MMP-9 and malate dehydrogenase (MDH) by western blot (WB); lactate dehydrogenase (LDH) activity, MMP-9 activity and pyruvate and lactate content were quantified using commercial assay kits.

The results obtained from each CM where compared to those obtained from the control medium.

### RESULTS

A total of 6 samples of patients with AAA were processed to obtain the CM, and 6 samples of non-aneurysmal aorta were processed for culture.

The expression of IL-1 $\beta$  and IL-6 was increased by CM-AAA and CM-M. CM-P increased the expression of IL-1 $\beta$  and CD40L, the latter not being increased by the other CM. A trend towards an increase in the expression of *gp91phox* in the three CM was observed, especially for CM-P.

## RESUMEN/ABSTRACT

MMP-9 activity was higher in tissue exposed to CM-M, without different between the other CM and controls. However, MMP-9 expression was decreased in the three CM compared to the control group.

In relation to the study of the metabolism, LDH activity was decreased in the CM. However, a decreased MDH expression was observed in the three CM, and in the case of CM-AAA this was associated with an increase in lactate content. No differences were observed in pyruvate content between CM and controls.

## CONCLUSIONS

The present results show an induction of characteristic AAA inflammatory changes by the three CM, although CM-P related changes are selective for chronic inflammation markers. Likewise, induction of other processes related to AAA pathophysiology have been observed, as are an increase in oxidative stress and modifications in MMP-9 expression and activity, which could manifest initial changes in the aneurysmal aorta.

CM-AAA induced in a very characteristic way metabolic changes previously observed in aneurysmal tissue, with an increase of anaerobic metabolism. This change cannot be caused by hypoxic conditions that may occur *in vivo*, because in our experiment this condition was not present.

Overall, CM-AAA has been the CM which most specifically has reproduced the changes observed in AAA, what suggests that the initial stimulus which causes the characteristic pathophysiological changes of the AAA is found in the aorta itself.





## II. INTRODUCCIÓN





## II INTRODUCCIÓN

### 1. ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL

#### II.1.1 Definición de aneurisma de aorta abdominal

La definición de la Sociedad de Cirugía Vascular de aneurisma es una dilatación localizada y permanente de una arteria que supone un incremento de al menos un 50% comparado con el diámetro normal esperado de dicha arteria(1). Los diámetros normales de cada arteria han sido establecidos por estudios poblacionales a través de métodos de imagen(2,3), y en el caso de la aorta, depende del sexo, la edad y el momento del ciclo cardiaco, siendo máximo durante la expansión sistólica(3).

La dilatación arterial afecta a las tres capas de la pared del vaso (íntima, media y adventicia), a diferencia de los falsos aneurismas o pseudoaneurismas, en los que la dilatación que se observa es causada por extravasación del flujo sanguíneo a nivel extravascular, donde es contenido por los tejidos periarteriales. Aunque morfológicamente y en pruebas de imagen puede asemejarse a un aneurisma, realmente no hay ninguna capa arterial dilatada y por lo tanto, no se denomina aneurisma.

La localización más frecuente de los aneurismas se encuentra en la aorta abdominal infrarrenal, donde se conocen como aneurismas de aorta abdominal (AAA). Éstos se definen como una dilatación de la aorta igual o mayor de 30 mm, puesto que los diámetros medios aórticos normales se encuentran entre 20 mm en varones y 18 mm en mujeres(2). La presente tesis centrará su estudio en esta entidad.

#### II.1.2 Epidemiología

Dado que la gran mayoría de los AAA cursan de forma asintomática, la mejor evidencia para estimar su prevalencia es a través de los resultados de estudios de cribado poblacional, ya que habitualmente estos estudios se realizan de forma aleatorizada. Un

## INTRODUCCIÓN

metaanálisis reciente basado en estudios de cribado estimó una prevalencia global del 4,8%, sobre 588.830 pacientes(4). La prevalencia variaba entre los distintos estudios incluidos entre el 1% y el 14% en varones. El amplio rango observado en los distintos estudios puede deberse a diferencias en las poblaciones estudiadas, en cuanto a edad, región geográfica y otros factores de riesgo.

Los factores de riesgo principales asociados a la existencia de un AAA son el sexo masculino, la edad avanzada(5) y el tabaquismo. Diferentes estudios basados en ecografía abdominal han demostrado prevalencias 5 veces mayores para el sexo masculino(6–8), coincidiendo con la prevalencia global estimada del 6,0% en varones y un 1,6% en mujeres, en el metaanálisis mencionado previamente. El tabaquismo es el factor extrínseco que más se asocia con la presencia de AAA, con OR que pueden llegar a 5(9), e incluso a 8, cuando el hábito tabáquico supera los 40 años(6).

Otros factores asociados con los AAA son la hipertensión arterial(4,9–11), hipercolesterolemia(4,7,8), la historia familiar de AAA(9), y enfermedad aterosclerótica a otros niveles como enfermedad coronaria(4,7,8,10), enfermedad cerebrovascular(4,8) e isquemia crónica de miembros inferiores(4,8,9). Los sujetos de raza negra parece tener una menor incidencia de AAA(9).

En cuanto a la distribución geográfica, Europa, Estados Unidos y Australia, son los países donde existe una mayor prevalencia de AAA(4,12). Esta prevalencia es menor en otros países desarrollados de Asia, como Japón y Corea(11,13).

Entre 1979 y 1988 se produjo un aumento en la incidencia de AAA tratados del 400% en Estados Unidos, sin un incremento desde entonces(14). Esto parece deberse a un mayor uso del ecodoppler abdominal durante esos años, aumentando así el número de pacientes diagnosticados de forma incidental. En la actualidad parece que la prevalencia de AAA está disminuyendo en los países más desarrollados, posiblemente en relación

## INTRODUCCIÓN

con una disminución del hábito tabáquico en la década de los 80 en estos países, como sugieren algunos autores(4,10).

Si comparamos las estimaciones de los años 90, en los que los AAA suponían la decimoquinta causa de muerte y la décima causa de muerte en varones mayores de 55 años en Estados Unidos(15), con las estimaciones actuales del CDC, en las que los AAA suponen la decimoséptima causa de muerte en varones mayores de 55 años entre 2000 y 2014(16), se observa una disminución en la frecuencia relativa de mortalidad por esta entidad. Esto puede ser debido tanto a una mejora en las técnicas diagnósticas, como a una mayor realización de éstas por otras causas, así como a la introducción del tratamiento endovascular de los aneurismas, que como se verá más adelante, ha supuesto una ampliación del rango de pacientes a los que se les puede realizar una reparación de un AAA antes de su rotura con un riesgo asumible.

### **II.1.3 Etiología**

Existen varios factores que la epidemiología ha asociado a la presencia de AAA, pero no se ha hallado ningún factor que se considere la causa de la aparición de los AAA. A pesar de la gran inversión económica y avances en el tratamiento quirúrgico, motivada por suponer una de las causas más frecuentes de morbimortalidad vascular en países desarrollados, la etiología de los AAA permanece completamente desconocida. Sí que ha habido avances en el conocimiento de su fisiopatología en las últimas décadas, habiéndose identificado factores mecánicos, inflamatorios, autoinmunes y arterioscleróticos involucrados en el desarrollo de AAA, pero sin conocerse por completo los mecanismos que causan estos procesos, ni los propios procesos en sí. Este desconocimiento hace que actualmente la fisiopatología de los AAA se base en diversas teorías, que se explicarán más adelante.

## INTRODUCCIÓN

### *II.1.3.a Estructura y fisiología de la pared aórtica sana*

Dado que los AAA constituyen una enfermedad de la pared aórtica, que se encuentra debilitada, se presenta necesario exponer cuál es la estructura y funcionamiento de la pared aórtica en condiciones normales, de cara a poder comprender los mecanismos que se ven afectados por esta patología.

La estructura de la pared arterial es común a lo largo de todo el árbol vascular, aunque la proporción de los distintos componentes varía según la región anatómica y el calibre del vaso. La pared arterial se compone de tejido conectivo formado por un componente celular y por un componente proteico extracelular conocido como matriz extracelular (MEC), que se encuentra organizado en tres capas: íntima, media y adventicia.

#### ❖ Íntima:

Es la capa más interna del vaso, y delimita con la luz del mismo. Su límite externo es la lámina elástica interna (LEI). La superficie luminal esta tapizada por endotelio, bajo el cual se encuentra una capa de tejido conectivo con escasas células musculares lisas (CML) denominada lámina basal y por último una capa elástica o fenestrada, la LEI.

Endotelio: Es una capa continua de células endoteliales (CE), que se encuentra en contacto directo con el flujo sanguíneo. Las CE tienen una morfología plana y poligonal, y además de constituir una barrera física para el flujo sanguíneo participan en procesos fisiológicos y patológicos, interactuando con su entorno para regular el tono vasomotor, el balance hemostático, la permeabilidad de la pared vascular, proliferación vascular y procesos inmunes e inflamatorios, a través de reacciones a procesos físicos, señalización química y mediadores inmunológicos(17,18).

## INTRODUCCIÓN

Las CE están cubiertas por glucocáliz, una capa de glicoproteínas que confieren propiedades antitrombóticas al endotelio(19) y se encuentran solapadas con las células adyacentes, alineadas en la dirección del flujo sanguíneo. Las membranas de CE adyacentes son paralelas(19) y se encuentran unidas por uniones estrechas (*zona occludens*), cuya principal función es mantener la polaridad de la membrana, y uniones de adherencia (*zona adherens*), menos abundantes y cuya principal función es la comunicación intercelular entre CE(19).

Las CE contienen vesículas pinocíticas que regulan la permeabilidad del endotelio, y son responsables del movimiento de material desde la luz del vaso a su pared. El oxígeno y los nutrientes necesarios para el metabolismo de la pared arterial se transportan a partir del flujo sanguíneo del vaso mediante difusión. En las arterias de mayor tamaño (aquellas con más de 29 lamelas), estos nutrientes no alcanzan todo el grosor de la pared arterial, y las capas externas (adventicia y la parte más externa de la capa media) se nutren a partir de la adventicia, mediante *vasa vasorum*.

Lámina basal: La lámina basal forma una barrera continua entre el endotelio y la capa subyacente, la LEI. Entre sus funciones destaca la regeneración y anclaje de la capa endotelial, mantenimiento de la permeabilidad vascular, barrera a la migración celular y tiene un papel en el inicio de la cascada de la coagulación(20). Asimismo, al tratarse de una sección especializada de la MEC, conecta el compartimento extracelular con las CE y CML(21).

Estructuralmente presenta dos zonas(18): la parte interna, denominada *lamina rara*, de baja densidad y compuesta fundamentalmente por laminina, una glicoproteína que juega un papel fundamental en la interacción CE-membrana basal, facilitando la unión entre las CE y el heparán sulfato con el colágeno tipo

## INTRODUCCIÓN

IV(21,22). El factor de von Willebrand (FvW) se encuentra embebido en el colágeno subendotelial, y juega un papel muy importante en la adhesión plaquetaria cuando existe una disrupción en el endotelio(23). La parte más externa, denominada *lamina densa*, está compuesta por colágeno tipo IV, que se caracteriza por ser rico en prolina, proporcionando flexibilidad y resistencia mecánica a la pared vascular.

Otros componentes de la lámina basal son: proteoglicanos (fundamentalmente heparán sulfato), colágeno tipo I y V, y otras moléculas de adhesión como fibronectina, entactina y trombospondina(24). El colágeno tipo IV de la lámina basal es producido por CE(20).

Lámina elástica interna: Es una capa de 70 a 100 nm de grosor compuesta por fibras elásticas, que a una presión normal se distiende para formar una banda circular. La elastina, sintetizada tanto por CE como por CML(25,26), se organiza en estructuras cilíndricas y fenestradas denominadas lamelas, que se disponen de forma concéntrica separadas por monocapas de CML(27).

### ❖ Media

Sus límites son la LEI (interno) la adventicia (externo). Es un tejido heterogéneo y poroso compuesto por una MEC y CML. A la presión arterial fisiológica, es la capa más influyente en las propiedades físicas de la pared arterial, dado que su elasticidad es la responsable de la distensibilidad de las arterias(28). Su composición y estructura tienen como objetivo asegurar la estabilidad arterial.

Está formada por CML vasculares, elastina y fibras de colágeno dispuestas de forma perfectamente organizada(29). De todos los tipos de colágeno intersticial, los tipos I y III son los predominantes, siendo el tipo I el mayoritario en las capas íntima y media de la aorta humana. Las capas de CML están formadas por grupos

## INTRODUCCIÓN

celulares con la misma orientación y están rodeadas por una membrana basal de similar composición a la LEI, que previene la proliferación y migración de las CML, y permite su adhesión a las fibras de colágeno y elastina. El colágeno tipo III forma un entramado que distribuye la tensión sobre los grupos celulares manteniéndolos juntos y evitando el deslizamiento y el estiramiento excesivo, ante aumentos de tensión por encima de la fisiológica (en condiciones fisiológicas estas fibras no se encuentran a tensión, y la tensión se distribuye principalmente entre las CML y la elastina(29)).

En arterias elásticas, la proporción de MEC es mayor que en las arterias musculares, y las lamelas están perfectamente definidas(30). La función de las arterias elásticas, que son las grandes arterias, como la aorta, es la de proporcionar un conducto para el flujo sanguíneo hacia los tejidos y suavizar las pulsaciones de la contracción ventricular intermitente, para lo que necesitan una pared elástica que ayude a amortiguar dichas pulsaciones. El número de lamelas disminuye de forma cardiófuga, siendo del orden de 40 a 60 en la aorta humana(19). Las arterias musculares predominan en las arterias de segundo o tercer orden, y en su capa media los elementos celulares son los predominantes, con fibras de elastina no organizadas que permiten el cambio de diámetro del vaso con la contracción de las CML, permitiendo regular el flujo sanguíneo que llega a los distintos territorios, a través de la modificación de la resistencia periférica.

### ❖ Adventicia

Se extiende desde la lámina elástica externa hasta un límite difícil de definir con el tejido perivascular continuo. De forma análoga a la capa media, su estructura varía en función del tipo de arteria, siendo mínima en la pared aórtica y muy prominente en las arterias musculares. Su composición celular es escasa y consiste



## INTRODUCCIÓN

fundamentalmente en fibroblastos, que se encuentran rodeados por colágeno y fibras elásticas.

Contiene *vasa vasorum* y fibras nerviosas, que proporcionan nutrición a la capa adventicia y a la parte externa de la capa media, y estímulos nerviosos (fundamentalmente del sistema nervioso autónomo que regula el tono vascular).

Únicamente las arterias mayores de 200  $\mu\text{m}$  contienen *vasa vasorum*.

### II.1.3.b La pared de los AAA

En la actualidad existen diversas teorías etiopatogénicas de los AAA, habiéndose identificado factores mecánicos, ateroscleróticos, inflamatorios e inmunes como participantes en la formación de los AAA, como se expondrá más adelante en profundidad. Anatómicamente, las tres capas de la pared aórtica se ven implicadas en la fisiopatología de los AAA.

La capa íntima contribuye a su formación a través de la formación por parte de las células endoteliales de especies reactivas de oxígeno (ERO). Existe una desestructuración y una disfunción endotelial(31) y es la zona de formación de trombo intraluminal (TIL), que contribuye a la activación plaquetaria y al reclutamiento de células polimorfonucleares (CPMN)(32), cuya extravasación contribuye a la degeneración aneurismática de la pared aórtica(33,34), y que se ha asociado con mayor inflamación en la adventicia(35).

La capa media de la aorta es la que presenta una mayor alteración estructural en los AAA, aunque, como se explicará más adelante, la inflamación se establece sobre todo en la capa adventicia(36). Como se ha mencionado previamente, la capa media en la aorta sana está compuesta por CML que se organizan en lamelas, que son las principales estructuras que soportan la tensión de la pared aórtica y por una MEC compuesta, entre otros, por elastina, colágeno tipo I y III y proteoglicanos. Durante la formación de los

## INTRODUCCIÓN

aneurismas, las lamelas se ven disminuidas de forma dramática, así como la cantidad de elastina existente en la pared, que mientras es degradada, es sustituida por colágeno, confiriendo a la pared de la aorta una mayor rigidez. Este cambio en la composición y las propiedades de la pared aórtica dirige al fracaso para mantener la integridad de la pared en las capas media y adventicia, lo que produce la rotura de los AAA.

La adventicia también tiene un papel activo en la fisiopatología de los AAA. La densidad de vasa vasorum disminuye en la aorta sana a lo largo de su recorrido a medida que se distancia de la raíz aórtica. Se ha observado que en aortas aneurismática existe una severa inflamación en las capas media y adventicia, en contraposición con los hallazgos en la patología oclusiva aortoiliaca en los que existe una inflamación leve-moderada de las capas íntima y media(36). Existe asimismo evidencia de neovascularización adventicial en muestras de AAA, y de que ésta es más intensa en los lugares donde se ha producido una rotura aneurismática(37), aunque se desconoce si esta neovascularización produce una progresión de la enfermedad aneurismática de forma activa o si simplemente representa una manifestación de la inflamación mural que se produce en esta patología.

### *II.1.3.c Factores mecánicos y hemodinámicos de la pared vascular y su implicación en los AAA*

Las fuerzas hemodinámicas que se producen en la aorta por el flujo sanguíneo pulsátil contribuyen de una forma esencial a la progresiva degeneración aneurismática de la aorta y finalmente a su rotura. Cuando consideramos las fuerzas biomecánicas, el término *estrés* hace referencia a la cantidad de fuerza ejercida sobre la pared arterial por unidad de área, mientras que el término *tensión parietal* hace referencia a la deformación de la pared (inducida por el estrés) por unidad de área.

Los vasos sanguíneos están expuestos de forma continua a fuerzas mecánicas cíclicas en forma de tensión circunferencial y fuerzas de cizallamiento. La presión arterial

## INTRODUCCIÓN

es el principal determinante del estrés circunferencial, con fuerzas tangenciales y circunferenciales que se producen en la pared del vaso como reacción a la presión arterial y afecta a todas las células de la pared arterial. La tensión por unidad de grosor ( $\sigma$ ) de la pared del vaso representa el estrés ejercido sobre dicha pared en la dirección circunferencial, y se representa por la siguiente formula:

$$\sigma = \frac{Pr}{h}$$

donde  $P$  es la presión sanguínea,  $r$  el radio del vaso, y  $h$  el grosor de su pared. De esta fórmula se deduce que cuanto mayor es el diámetro del vaso, para un mismo grosor de pared (como es el caso de los AAA), mayor es la tensión que sufre.

La fuerza (o estrés) de cizallamiento ( $\tau$ ) es el resultado de la interacción del flujo sanguíneo con la pared del vaso y tiene una dirección paralela a dicha pared afectando fundamentalmente a las CE en la interfase sangre-pared vascular. Se calcula a través de la siguiente ecuación:

$$\tau = \frac{4\mu Q}{\pi r^3}$$

donde  $\mu$  es la viscosidad de la sangre,  $Q$  el flujo sanguíneo y  $r$  el radio del vaso. De esta fórmula se deduce que un incremento en el radio del vaso puede disminuir la fuerza de cizallamiento que se produce sobre él.

Por lo tanto, las fuerzas que actúan sobre la pared vascular (estrés) derivan de la presión y el flujo sanguíneo, que son variables durante el ciclo cardíaco. Los cambios en dicho estrés inducen modificaciones a corto y largo plazo en las arterias que tratan de compensar estos cambios, para llevar las fuerzas que actúan sobre los vasos a niveles basales. Si los cambios son agudos se producen mediadores vasoactivos que producen compensaciones transitorias, mientras que si los cambios en el estrés sobre la pared se

## INTRODUCCIÓN

mantienen en el tiempo, se produce un remodelado vascular y alteraciones adaptativas que afectan de manera significativa a la forma y composición del vaso.

Se ha demostrado que un incremento en el estrés circunferencial induce un incremento e hipertrofia de CML, así como producción de elastina y colágeno(38). Un incremento en las fuerzas de cizallamiento (secundario a un aumento del flujo arterial), activa la vía de la L-arginina/NO en las CE. Cuando se mantiene de forma crónica, también estimula la producción de metaloproteinasas (MMP), especialmente la MMP-9 y la MMP2 que, a través de la degradación de la MEC en la capa media y de la LEI producen apoptosis, dilatación y remodelado vascular(19). Esta dilatación se mantendrá hasta la normalización de las fuerzas de cizallamiento. Aunque ambas fuerzas contribuyen a la formación y progresión de los aneurismas, las fuerzas circunferenciales tienen una influencia mucho mayor (10000 veces mayor) en precipitar la rotura de los aneurismas.

Por otro lado, el flujo arterial normal es laminar. Esto implica que la sangre se mueve en capas concéntricas que se deslizan unas sobre otras, siendo la velocidad máxima en el centro del vaso y mínima en las zonas próximas a la pared arterial. Esto se debe a que la sangre presenta una resistencia al movimiento, que se denomina viscosidad. Cuando el patrón de flujo se caracteriza por factores de velocidad aleatorios y no paralelos, se denomina flujo turbulento. El tipo de flujo que tiene un fluido depende del número de Reynolds ( $Re$ ), que es adimensional y se calcula a través de la siguiente ecuación:

$$Re = \frac{\rho \bar{V} D}{\mu}$$

Donde  $\rho$  es la densidad del fluido,  $\bar{V}$  la velocidad media del flujo y  $\mu$  su viscosidad.  $D$  representa el diámetro del vaso por el que circula dicho fluido. Cuando el valor de  $Re$  supera 2000 se producen flujos turbulentos. Así, cuando aumenta el diámetro del vaso,

## INTRODUCCIÓN

como es el caso de los AAA, se forma un flujo turbulento que favorece la aparición de trombo intraluminal (TIL). Este trombo tiende a dejar una luz similar a la de la aorta sana, y aunque no protege la pared arterial del estrés parietal circunferencial (aumentado por el aumento de diámetro del vaso)(39), sí que produce un estado de hipoxia en las capas más próximas a la luz(31), así como activación plaquetaria e inducción de señales proinflamatorias(32,34).

El estrés hemodinámico y la tensión producida sobre la pared de los vasos han sido objeto de estudio mediante modelos físicos y modelos informatizados mediante métodos de elementos finitos(40). Utilizando estos modelos, se observa que la tensión focal pico es mayor en los aneurismas sintomáticos y rotos que en los pacientes a los que se les realiza una reparación programada de AAA, incluso a igualdad de diámetro máximo, lo que sugiere que las condiciones de la luz del vaso juegan un papel igual o superior en la rotura del aneurisma que la integridad de la tracción de la pared del vaso.

### *II.1.3.d Teorías etiopatogénicas de los AAA*

#### *II.1.3.d.i Teoría arteriosclerótica*

Los AAA se han ligado tradicionalmente a los procesos arterioscleróticos, a pesar de que la dilatación arterial característica de los AAA difiere tangencialmente de la formación de estenosis y oclusiones en la luz de los vasos afectados por patología arteriosclerótica. Por esta asociación, en el pasado los aneurismas que actualmente se denominan inespecíficos, se han conocido como arterioscleróticos.

La arterioesclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica en la que se producen una serie de procesos complejos: proliferación y migración celular, especialmente a nivel subintimal, depósito intimal de lípidos, inflamación, fibrosis y necrosis. Estos procesos dan lugar, finalmente, a la formación de la placa arterioesclerótica como respuesta a un

## INTRODUCCIÓN

daño endotelial(41). Cuando ésta se forma, las arterias sufren una remodelación que lleva al crecimiento de la arteria para intentar mantener el diámetro de su luz(42,43).

Debido a que existen factores de riesgo comunes, una mayor prevalencia de enfermedad aterosclerótica coronaria, carotídea y en miembros inferiores en los pacientes con AAA(4,7–10), y a que en la pared de la aorta aneurismática a menudo se pueden observar placas de ateroma, se han identificado tanto la patología arterial oclusiva como la patología aneurismática como distintas presentaciones de la enfermedad aterosclerótica(44).

En los últimos años esta idea se está abandonando, dado que existen una serie de diferencias entre ambas enfermedades:

- ❖ Aunque la hipercolesterolemia constituye un factor de riesgo para AAA, los niveles medios de colesterol plasmático son muy inferiores a los registrados en los pacientes que presentan arterioesclerosis(45).
- ❖ La hipertensión, como hemos visto previamente, puede producir de forma directa la dilatación de un vaso que se encuentra predispuesto por su debilidad. Este fenómeno es independiente de la proliferación subintimal típica en la degeneración arterioesclerótica(45,46).
- ❖ Los resultados tras la reparación quirúrgica de la aorta difieren en función de que la reparación se haya realizado por patología aneurismática o por patología oclusiva, siendo asimismo diferentes las complicaciones que aparecen a largo plazo(47).
- ❖ Los pacientes afectos de AAA son más frecuentemente a varones, con mayor edad y con menor enfermedad oclusiva periférica en territorios distintos al aortoiliaco que los pacientes con enfermedad oclusiva del sector aortoiliaco(47).

## INTRODUCCIÓN

- ❖ El tabaco, inhibidor de factores antiproteolíticos que protegen la matriz como la  $\alpha$ 1-antitripsina, puede tener un efecto independiente sobre la aparición de AAA(45).
- ❖ Existe una asociación entre los AAA y determinadas patologías no relacionadas con la arterioesclerosis, como son el enfisema y las hernias inguinales. Esto puede deberse la presencia de determinadas condiciones patológicas sistémicas independientes de la arterioesclerosis(48–50).
- ❖ Una posible explicación para la aparición de lesiones ateroscleróticas en los aneurismas es la presencia de un flujo turbulento en los mismos debido al aumento de diámetro de la luz arterial. En las bifurcaciones arteriales se puede observar flujo turbulento de forma fisiológica, y es precisamente en las bifurcaciones arteriales donde más frecuentemente asientan las lesiones ateroscleróticas(51), ya que éste puede inducir proliferación subintimal.
- ❖ La presencia de aneurismas en otras localizaciones se asocia con mayor frecuencia a pacientes con AAA que a pacientes con arteriosclerosis(48).
- ❖ Análisis proteómicos realizados en muestras de AAA y de aorta con patología oclusiva evidencian grandes diferencias en cuanto a la expresión proteica entre estas dos entidades(52).

Aparte de diferencias en cuestiones epidemiológicas, también se han observado diferencias en estudios anatomopatológicos, contribuyendo a poner en duda cada vez más el origen arteriosclerótico de los aneurismas. Los hallazgos de estos estudios(36), se resumen en los siguientes puntos:

- ❖ En los AAA la íntima se encuentra muy atrófica y pobremente conservada, la media, aunque conservada, se encuentra muy atrófica, con una marcada

## INTRODUCCIÓN

disminución de CML y existe una gran reacción inflamatoria en la adventicia. En la arteriosclerosis, son características las placas arterioscleróticas en la íntima, la reacción inflamatoria se localiza en la media y no existe afectación de la adventicia (o ésta es mínima).

- ❖ También se han hallado diferencias en la localización y el tipo y la intensidad del infiltrado inflamatorio existente en los AAA y en la patología oclusiva aortoiliaca: En los AAA existe un infiltrado mucho más variado: constituido por linfocitos T con un índice CD4+/CD8+ de 7:1, linfocitos B (que representan el 25% de las células inflamatorias), y macrófagos infiltrando media y adventicia. En contraposición, en el infiltrado en la enfermedad oclusiva aórtica predominan los linfocitos T, con un índice CD4+/CD8+ de 4:1 (menor presencia de linfocitos T<sub>H</sub>), donde los linfocitos B, son muy escasos y los macrófagos, localizados en la placa arteriosclerótica, son menos abundantes que en los AAA. que se ubican principalmente en la placa arterioesclerótica. Además, el infiltrado en los AAA es mucho más intenso y localizado especialmente en la adventicia (66% de las células inflamatorias frente al 34% en la patología oclusiva) (ver figura II.1).



## INTRODUCCIÓN

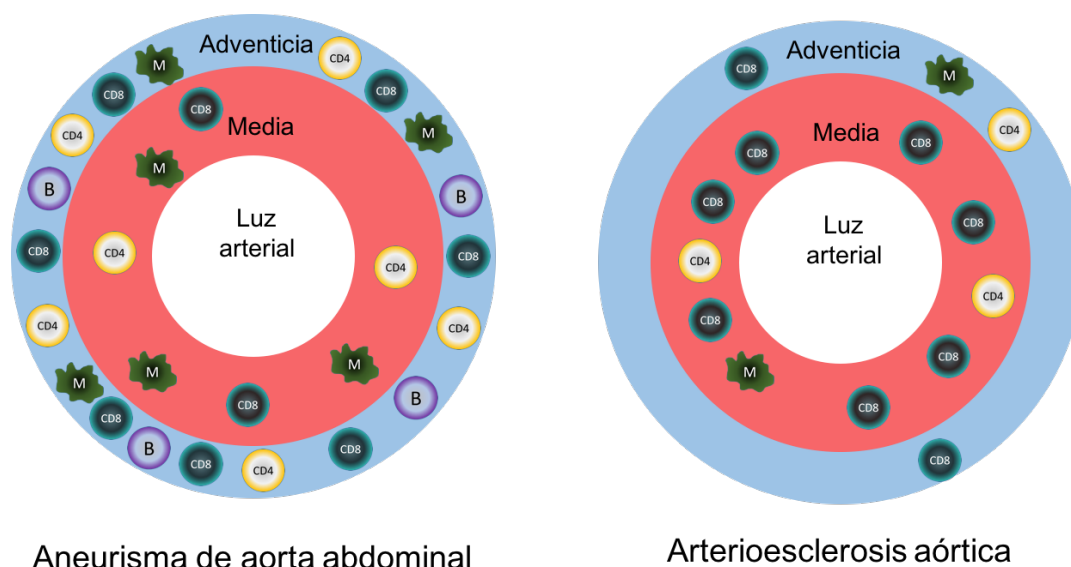


Figura II.1: Diferencias en las poblaciones y localización de las células inmunes en la pared de la aorta afectada por arterioesclerosis y por AAA. Adaptado de: Moñux Ducajé G. Papel de la autoinmunidad en la génesis de los aneurismas de aorta abdominal. Estudio inmunogenético [tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2003.

### II.1.3.d.ii Teoría mecánica

La mayor incidencia de aneurismas de aorta en su segmento infrarrenal (5 veces mayor que en la aorta torácica), se puede explicar por la presencia de condiciones hemodinámicas variables a lo largo de toda la aorta. Cuando la comparamos con los segmentos suprarrenales, la aorta infrarrenal presenta una mayor resistencia periférica, un mayor estrés de tangencial y un menor flujo en condiciones de reposo (con menor estrés de cizallamiento). Estas condiciones, características de la actividad sedentaria, han sido identificadas como factores predisponentes para enfermedades degenerativas de la pared arterial(53). Esta influencia de las fuerzas hemodinámicas ha sido demostrada en modelos experimentales en animales. La expresión de MMP-9 en la aorta infrarrenal murina sana es mayor que en segmentos más proximales durante el reposo. La transposición de la aorta abdominal a la posición torácica, reduce la expresión de MMP-9 en su pared, y lo incrementa cuando se transpone la aorta torácica a una posición abdominal(54).

## INTRODUCCIÓN

La concentración de las tensiones hemodinámicas en la aorta infrarrenal se debe a tres factores(55,56):

- ❖ La disminución de calibre en el segmento distal de la aorta.
- ❖ El aumento progresivo de la rigidez de la pared aórtica, especialmente al penetrar en el abdomen.
- ❖ Los efectos aditivos de las ondas de presión retrógradas que se reflejan en las bifurcaciones ilíacas y se combinan con la onda de presión anterógrada aferente.

Estas características hemodinámicas contribuyen a la formación de una zona de tensión hemodinámica relativamente elevada en la aorta infrarrenal. La pared de la aorta torácica presenta un número de lamelas que soportan una tensión local de 2000 dynas/cm. Sin embargo, en la aorta abdominal el número de lamelas se encuentra muy disminuido, por lo que soportan una tensión local de 3000 dynas/cm, un 50% mayor que en la aorta torácica(57).

Las fuerzas hemodinámicas también pueden influir directamente sobre la fisiología celular. Las CML vasculares cultivadas sufren unos cambios fenotípicos específicos en respuesta a la reducción de las fuerzas tangenciales anterógradas y oscilatorias. Estos cambios pueden consistir en un aumento de la expresión de mediadores inflamatorios y oxidativos y en una disminución de la viabilidad celular(53,58,59).

Otra característica peculiar de la aorta abdominal infrarrenal es que los *vasa vasorum* son más escasos en su pared, encontrándose deficitaria de nutrientes respecto a la aorta torácica. La unión de los factores físicos a la disminución de nutrientes con los subsiguientes cambios metabólicos en la pared puede dar lugar a la aparición de una debilidad local que predisponga al desarrollo de aneurismas en esta localización.

## INTRODUCCIÓN

### *II.1.3.d.iii Teoría inmunológica-inflamatoria*

Frente a la teoría aterosclerótica original de los AAA, en la década de los 80 aparecieron estudios que proponían mecanismos diferentes en la patogenia de los AAA y la aterosclerosis aórtica. En las teorías actuales sobre la fisiopatología de los AAA, la inflamación representa una parte fundamental, con características comunes a otras formas de enfermedades inflamatorias crónicas(60).

La respuesta inflamatoria explica la degeneración aneurismática de una manera más plausible que la arteriosclerosis: las células inflamatorias, principales productoras e inductoras de la producción de metaloproteinasas (MMP) y citoquinas, actúan promoviendo la destrucción de la MEC(61,62) e inhibiendo la regeneración de la misma a través de la inducción de fenómenos apoptóticos sobre las CML(63), principales regeneradoras de la MEC. Además, el entorno inflamatorio favorece un estado aumentado de estrés oxidativo, en el que se producen ERO que causan daño tisular. Estos tres procesos, interrelacionados entre si y que se retroalimentan, juegan un papel muy importante en la fisiopatología de los AAA y por ello serán tratados en profundidad.

#### ❖ Apoptosis celular:

La apoptosis celular, también conocida como muerte celular programada se diferencia de la necrosis en que constituye un complejo sistema ordenado, mediado por una cascada de enzimas denominadas caspasas, y está sometido a un control extra e intracelular estricto.

Existen dos vías de apoptosis:

La **vía extrínseca** de la apoptosis se inicia mediante activación de receptores transmembrana de una familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR). Las vías que activan estos receptores confluyen en la formación de un complejo que activa la cascada de las caspasas iniciándose la

## INTRODUCCIÓN

fase de ejecución de la apoptosis, mediante la degradación, por las caspasas de proteínas estructurales y proteínas necesarias para la transcripción y modificación postranscripcional del ADN, así como del propio ADN.

La **vía intrínseca** es desencadenada por daño en el ADN, por estrés celular, o por un aumento de ERO generadas en la mitocondria. La proteína central de esta vía es el gen supresor de tumores p53, que activa proteínas proapoptóticas que se encuentran fundamentalmente en la membrana externa mitocondrial, el retículo endoplasmático y la membrana nuclear(64) (cuyas mutaciones se encuentran frecuentemente asociadas a determinado tipo de tumores). La activación de estas proteínas aumenta la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial produciéndose la liberación de proteínas mitocondriales como el citocromo C y Apaf-1, que activan las caspasas. Una vez activadas las caspasas, la vía final es común con la extrínseca.

Entre las proteínas que aumentan la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, la familia de la Bcl-2, compuesta por 25 proteínas, constituye un punto clave. Dividida en 3 subfamilias: Bcl-2, Bax y BH3, de las cuales la primera estaría formada por proteínas anti-apoptóticas que inhiben las otras dos subfamilias, formadas por proteínas pro-apoptóticas. Se han identificado alteraciones en el balance de estas proteínas pro y anti apoptóticas (a favor de las proteínas proapoptóticas) en muestras de aneurismas de aorta humana(65).

### ❖ El papel de las metaloproteinasas

Las MMP son un grupo de enzimas de la MEC esenciales en la remodelación tisular y la resorción ósea, procesos fisiológicos en ambos casos. Son secretadas por CML, fibroblastos, neutrófilos y macrófagos de la pared celular en forma de zimógeno (precursor pro-MMP). Su activación extracelular está

## INTRODUCCIÓN

mediada por proteasas como plasmina, activador tisular del plasminógeno y otras MMP. También existen los mecanismos inhibitorios entre los que destacan los TIMP (del inglés *tissue inhibitors of metalloproteinases*).

En las últimas décadas, se ha demostrado su implicación en la patogénesis de los AAA(66), donde se encuentran sobreexpresadas, promoviendo la degradación excesiva de la MEC. Se han descrito varias MMPs implicadas en los AAA. Las más específicamente relacionadas son:

**MMP-2 (Gelatinasa A):** Degrada la elastina y se localiza en la media y adventicia. Se encuentra aumentado en la aorta aneurismática, especialmente cuando el tamaño es pequeño(67), aunque también ha sido detectado en cultivos celulares de CML de aorta humana(68).

**MMP-9 (Gelatinasa B):** Degrada la elastina el colágeno tipo I y IV y el fibrinógeno. Es producida fundamentalmente por los macrófagos de la adventicia y por fibroblastos, aunque también es producida por otros grupos celulares como neutrófilos activados y plaquetas(69,70). Considerada la principal MMP, se encuentra implicada tanto en la patogenia como en la progresión de los AAA(71)(72) y sus niveles en plasma se han asociado con un mayor diámetro aneurismático y crecimiento(73). Al igual que la MMP-2, se ha encontrado muy aumentada en muestras de aneurismas de aorta abdominal aunque también se ha identificado en cultivos de CML de aorta humana no aneurismática(68). Parece existir una relación sinérgica y codependiente entre las dos MMPs puesto que ambas deben estar presentes y activadas para producir una progresión máxima del AAA(74).

Las TIMP, comprenden un grupo de cuatro proteínas: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Son los principales reguladores de la actividad de las MMP

## INTRODUCCIÓN

a nivel tisular. Poseen una gran afinidad y especificidad por unas determinadas MMPs para cada TIMP(75): ejemplos de ello son la unión de TIMP-2 al zimógeno proMMP-2(76,77) formando un complejo activador de la MMP-2, o la de TIMP-1 con proMMP-9 que es específica.(78). Se cree que también están implicadas en muchos otros procesos no biológicos no necesariamente relacionados con la proliferación celular(75), aunque éste es un campo en el que quedan aún avances por realizar.

### ❖ Estrés oxidativo y AAA

Las ERO incluyen radicales libres de oxígeno, iones superóxido y peróxidos, y son producidos de forma fisiológica como consecuencia del metabolismo celular normal, y en condiciones fisiológicas son reducidas gracias a enzimas que aseguran un entorno reductor a través de consumo energético, evitando así el daño tisular que producen estas sustancias.

En entornos inflamatorios, las CPMN y los macrófagos adquieren la capacidad de producir ERO tras su activación, a través del consumo de oxígeno no asociado al transporte electrónico mitocondrial en un proceso denominado *estallido respiratorio*, por la acción de la NADPH oxidasa(79). Ésta, cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el oxígeno con la formación de un radical superóxido, que rápidamente es transformado a peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso. Éstos, constituyen el mecanismo fundamental de defensa de las CMPN(79), así como de destrucción de productos fagocitados en el fagosoma. No obstante, no sólo los fagocitos son capaces de formar iones superóxido: CML vasculares, CE y fibroblastos, son capaces de formar iones superóxido a través de varias vías, incluyendo una NADPH oxidasa no fagocítica(60).

## INTRODUCCIÓN

La NADPH oxidasa está formada por varias subunidades que se encuentran distribuidas entre el citoplasma y la membrana plasmática cuando esta es inactiva. Entre estas subunidades destacan la gp91phox y la gp67phox, que se cree que poseen los sitios de unión para el FAD y el NADPH(80), y que se han utilizado como marcador del nivel de estrés oxidativo de los tejidos.

Se ha identificado la NADPH oxidasa como la principal fuente de estrés oxidativo en los AAA(60,81), donde existen niveles aumentados de la actividad de esta enzima, con formación de ERO que contribuyen a la formación del AAA mediante daño tisular y celular directo, aunque también de forma indirecta a través de la activación de MMP-9(82) y de la inducción de apoptosis(83). Factores mecánicos(84) (estrés parietal), inmunológicos (mediados por macrófagos a través de citoquinas proinflamatorias(60)), factores de crecimiento (angiotensina II y PDGF(85)), mediadores lipídicos (leucotrienos y ácido lisofosfatídico y LDL), así como las propias ERO incrementan la actividad de la NADPH oxidasa presente en las células del tejido vascular(81). Dentro del estudio de las subunidades de la NADPH oxidasa se ha observado un incremento de la gp91phox y de la gp67phox en AAA, y no así de otros componentes de esta enzima(86).

Existen, no obstante, hallazgos que sugieren que la respuesta inmune celular modula la patogénesis de los AAA. Los linfocitos CD4<sup>+</sup> (linfocitos T<sub>H</sub>), son abundantes en los AAA, y las citoquinas tipo Th-1 como IL1 y TNF $\alpha$  (ver, más adelante, el apartado II.2.2.b activación linfocitaria y tipos de respuesta inmune), que aumentan la expresión de MMP en los macrófagos(87,88), predominan en los AAA(61,62,89). Sin embargo también se ha observado un aumento de citoquinas tipo Th-2 o antiinflamatorias (IL-4, IL-5 o IL-10) también se encuentran aumentadas, especialmente en fases más avanzadas,

## INTRODUCCIÓN

sugiriendo que pueden existen ciertos procesos endógenos que tratan de suprimir la destrucción celular(89–91).

### **II.1.4 Clínica**

#### *II.1.4.a AAA sin rotura*

La mayoría de los AAA son asintomáticos mientras no exista una rotura de su pared y son diagnosticados mediante técnicas de imagen realizadas para el estudio otras patologías no relacionadas. Ocasionalmente, los pacientes pueden sentir el pulso en su abdomen, o palparse una masa pulsátil. Aunque muy poco frecuente, los AAA de gran tamaño pueden causar síntomas derivados de compresión local, como saciedad precoz, náuseas o vómitos secundarios a compresión duodenal; síntomas urinarios por compresión ureteral, que causaría hidronefrosis; o trombosis venosa por compresión iliacava. También puede manifestarse como dolor lumbar debido a la erosión de las vértebras lumbares por la cara posterior del aneurisma. Incluso sin afectación ósea, los AAA pueden causar dolor lumbar o abdominal crónico.

La embolización distal del TIL de los AAA puede producir síntomas isquémicos, que son más frecuentes en pacientes con AAA de menor tamaño, especialmente si el TIL es irregular o fisurado(92). La trombosis aguda de los AAA es una entidad muy poco frecuente, pero causa una isquemia con una mortalidad muy elevada. La embolización distal es mucho más frecuente que la trombosis aguda de los AAA, aunque la frecuencia de ambas es menor del 2-5%.

#### *II.1.4.b AAA roto*

La mayoría de los AAA que presentan síntomas lo hacen debido a una rotura de su pared o a una expansión aguda, que generalmente precede a la rotura. La triada clásica que caracteriza a los AAA rotos consiste en dolor abdominal o lumbar severo, hipotensión



## INTRODUCCIÓN

y una masa pulsátil abdominal palpable(93,94). Un episodio sincopal puede indicar hipotensión si ésta no ha sido documentada.

### II.1.5 Historia Natural de los AAA

La evolución natural habitual de los AAA consiste en el crecimiento progresivo de los mismos hasta su rotura. No obstante, existe una variabilidad interpersonal. El crecimiento medio de los AAA de entre 30 y 55 mm de diámetro máximo, es de 2-3 mm/año, existiendo una relación directa entre el crecimiento y el diámetro inicial, con crecimientos medios de 4,1 mm/año cuando los aneurismas miden entre 40 y 50 mm y de 5,1 mm/año cuando son mayores de 50 mm(95). El tabaquismo es el factor que más asociación ha mostrado con el crecimiento, tras el diámetro(96) (2,6 mm/año en fumadores; frente a 1,7 mm/año en no fumadores). Por el contrario, datos relacionados con la diabetes, sugieren una asociación negativa para la existencia y crecimiento de los AAA(97,98). El papel de las estatinas es controvertido: existen estudios, tanto experimentales *ex vivo* como estudios clínicos(99–102), que relacionan su uso con un menor crecimiento de los AAA debido a la disminución de la producción de proteínas proinflamatorias, entre las que se incluye la MMP-9(103). Sin embargo, otros trabajos arrojan resultados que contradicen estos estudios, como el realizado en varios centros independientes de Australia y Nueva Zelanda en 2010, que incluye 652 pacientes con AAA de pequeño tamaño con seguimiento ecográfico durante 5 años, en el que el uso de estatinas no mostró beneficio sobre el crecimiento de los AAA(104).

Tras la rotura de un AAA, un 30-50% de pacientes fallecen antes de su llegada a un centro hospitalario, con una mortalidad global del 80%(105).

Desde los años 60, el principal factor determinante del riesgo de rotura de los AAA ha sido el diámetro máximo del aneurisma. Estudios anteriores a la generalización de la reparación quirúrgica de los AAA, como los de Brewster(106), Foster(107) o

## INTRODUCCIÓN

Conway(108) establecieron el riesgo de rotura en función del diámetro aneurismático, con tasas de rotura anuales que incrementan de forma exponencial, según se muestra en la figura II.2.

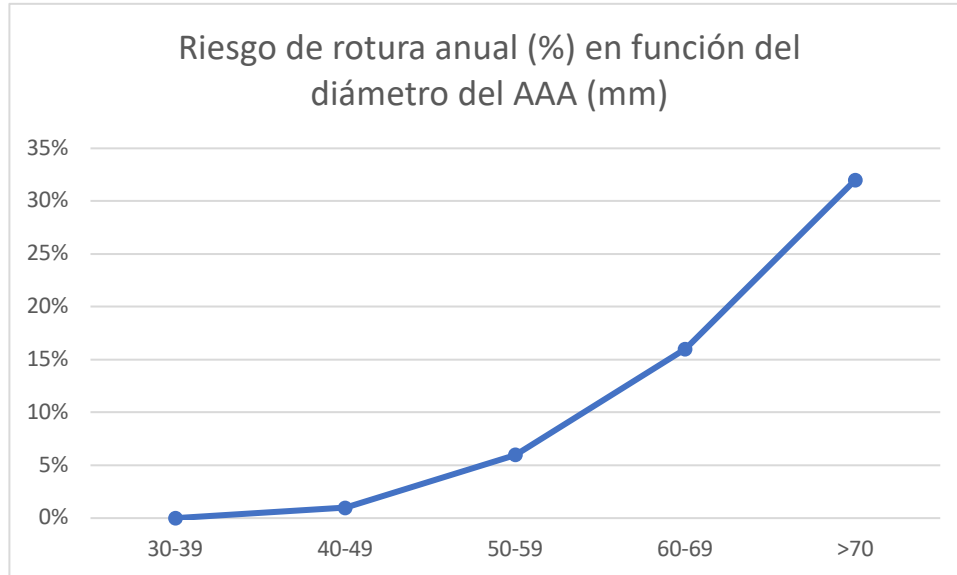


Figura II.2: Fuente: Elaboración propia a partir de los datos de la Guía de Práctica Clínica en el manejo de los aneurismas de aorta abdominal de la Sociedad Europea de Cirugía Vascular (ESVS)(109).

Sin embargo existen aneurismas que se rompen con diámetros pequeños (30-50 mm), y algunos de gran tamaño continúan creciendo sin romperse, por lo que factores como una tasa de crecimiento rápida, el sexo femenino(110), la historia familiar, una forma sacular del aneurisma y el incremento del trombo intraluminal(111) parecen favorecer la rotura.

Desde hace años algunos autores han sugerido que, dado que un AAA no tiene una forma esférica o cilíndrica ideal (donde según la ley de Laplace el diámetro máximo sería el mejor predictor de rotura), modelos matemáticos que tengan en cuenta la asimetría de los AAA, como el análisis de elementos finitos (AEF) serían superiores que el diámetro máximo para prevenir su rotura(112–114). Sin embargo, aún son necesarios estudios multicéntricos que validen esta técnica, y por lo tanto actualmente el *gold standard* para predicción de rotura de los AAA continúa siendo el diámetro máximo.

### II.1.6 Diagnóstico

La mayoría de los AAA son asintomáticos en el momento de su diagnóstico, y por ello, lo más frecuente es que sean diagnosticados de forma incidental a través de una prueba de imagen solicitada por otra razón.

Es posible sospechar la presencia de un AAA mediante la palpación de una masa pulsátil en el mesogastrio, aunque la sensibilidad de esta técnica depende el tamaño del aneurisma, el perímetro abdominal del paciente, y tanto de la habilidad del examinador como de su intención de descartar un AAA(115). En aneurismas mayores de 50 mm, no obstante, la sensibilidad de la exploración física puede alcanzar el 75%(116). También existen factores, como la tortuosidad aórtica, una presión de pulso amplia, o una masa preaórtica que transmita el pulso que pueden producir falsos positivos en la exploración. Por otro lado, no es una exploración precisa para determinar el diámetro de un aneurisma.

Por lo tanto, es necesaria una prueba de imagen para confirmar el diagnóstico y conocer el diámetro del aneurisma:

#### II.1.6.a Ecografía abdominal (EA)

Es el método más barato, no invasivo y por lo tanto el más frecuentemente utilizado para confirmación inicial ante la sospecha de un AAA y para el seguimiento de AAA de pequeño tamaño. No obstante, tiene ciertas desventajas respecto a otras técnicas: no puede determinar de forma precisa la rotura del aneurisma(117), la visualización de la aorta suprarrenal y las arterias ilíacas puede ser dificultosa por el gas intestinal(118), y comparado con la TC, la EA típicamente infraestima el diámetro anteroposterior de los AAA entre 2 y 4 mm(119–122). Por ello, la EA se usa para diagnosticar y monitorizar AAA hasta que se aproximan a un diámetro en el que se puede considerar la reparación, momento en el que técnicas de imagen más precisas son necesarias para una evaluación preoperatoria.

## INTRODUCCIÓN

### II.1.6.b Tomografía computerizada (TC)

La TC es más cara e implica exposición a radiación ionizante y administración de contraste intravenoso, pero es una técnica rápida que proporciona medidas del diámetro del AAA mucho más precisas. Además, define con precisión la extensión proximal y distal del AAA, el estado de las arterias ilíacas y permite la identificación de aneurismas inflamatorios. Las TC espirales son particularmente precisas y proporcionan información de la relación del AAA con las arterias viscerales y renales. Esta información es útil para decidir el tipo de cirugía, conocer su extensión y su dificultad. Además permite la realización de reconstrucciones tridimensionales (ver figura II.3), lo que ha suplantado la arteriografía en la evaluación preoperatoria de los pacientes con AAA(123). Por este motivo, la TC es actualmente la modalidad de imagen principal en la evaluación preoperatoria de los AAA(124), y es particularmente útil para excluir la rotura de un AAA en pacientes estables pero sintomáticos.

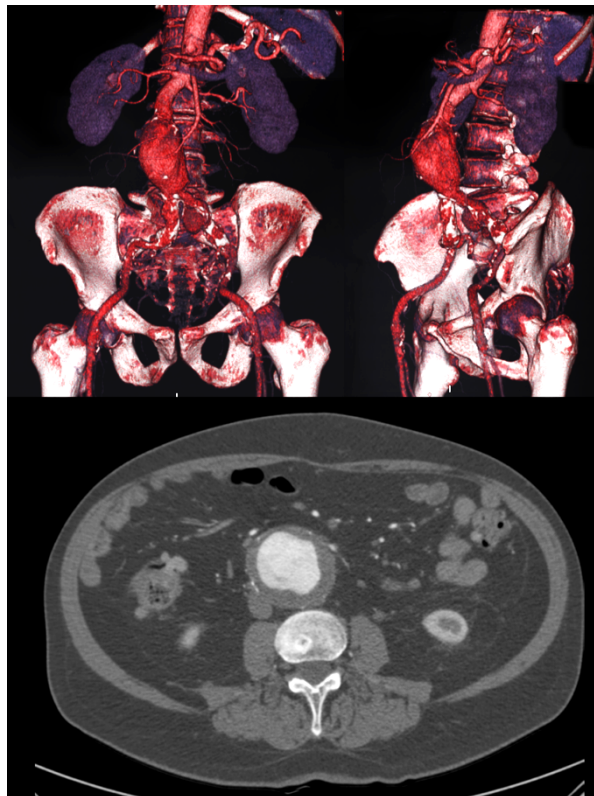


Figura II.3: Reconstrucción tridimensional a partir de una TC en la que se observa un AAA infrarrenal. La imagen inferior muestra un corte axial de dicha TC.

## INTRODUCCIÓN

### *II.1.6.c Resonancia magnética nuclear (RMN)*

La RMN también proporciona mucha más información que la EA, pero supone una serie de inconvenientes que han hecho que su uso no se estandarice para el estudio de los AAA. La angio resonancia magnética (ARM) es comparable en muchos aspectos con la TC, especialmente en cuanto a precisión para medir el diámetro y la evaluación preoperatoria, y evita el uso de radiación ionizante. No obstante, tiene la mitad de resolución espacial que la TC, no detecta placas de calcio adecuadamente, es más cara y más difícil de estandarizar, y los pacientes toleran peor la exploración en caso de claustrofobia. Por todo ello la TC ha relegado a la ARM a un papel secundario en la evaluación de los AAA.

### *II.1.6.d Arteriografía*

Históricamente la arteriografía era la prueba empleada para la evaluación preoperatoria de los AAA. Actualmente la disponibilidad de la TC y de la RMN han relegado a la arteriografía como método de imagen intraoperatorio en el tratamiento endovascular, no siendo útil en la actualidad en el diagnóstico preoperatorio ni como planificación quirúrgica.

## **II.1.7 Tratamiento**

Actualmente la única vía terapéutica para los AAA es la quirúrgica. A pesar de los avances en el conocimiento de su etiopatogenia no existen fármacos disponibles para la resolución de esta patología.

El tratamiento quirúrgico está indicado cuando el riesgo acumulado de rotura (estimado en la actualidad a través del diámetro del aneurisma, fundamentalmente) supera

## INTRODUCCIÓN

el riesgo asociado de la cirugía, teniendo en cuenta la esperanza de vida del paciente a estudio(109).

En base a los resultados arrojados de grandes ensayos clínicos(125–128), puede afirmarse que existe seguridad en la observación y seguimiento de los AAA < 55mm de diámetro máximo, estando indicada la cirugía en aquéllos que superan este tamaño, tal y como reflejan las guías europea(109) y americana(129). Esta recomendación es modificable en presencia de factores como el riesgo del procedimiento quirúrgico, tabaquismo activo, el sexo femenino, la anatomía del aneurisma, y la esperanza de vida del paciente(110,130).

Existen dos estrategias quirúrgicas en los AAA: La cirugía abierta convencional, que consiste en la resección aneurismática y reemplazo por la interposición de un injerto protésico, requiriendo un clampaje aórtico y suponiendo un mayor riesgo perioperatorio; y el tratamiento endovascular (EVAR, del inglés: *endovascular aortic repair*), que consiste en la exclusión del AAA de la circulación mediante la implantación de una endoprótesis, habitualmente a través de un abordaje transfemoral. Requiere unas características anatómicas concretas que permitan una implantación estable de la endoprótesis, y requiere un seguimiento postoperatorio más estrecho que la cirugía abierta, mediante pruebas de imagen.

Desde la introducción del EVAR a principios de los años 90, ha existido un gran incremento en el número de procedimientos realizados mediante ésta técnica(131), aportando unos excelentes resultados y una menor morbilidad en relación con la cirugía abierta convencional. Poco a poco el EVAR ha permitido ampliar el número de pacientes candidatos a la reparación de AAA, y en la última década también el espectro anatómico incluyendo extensiones a nivel suprarrenal y toracoabdominal (mediante endoprótesis con ramas y fenestraciones para los vasos viscerales).

## INTRODUCCIÓN

Sin embargo, dada la mayor necesidad de reintervenciones secundarias, en su mayor parte debido a endofugas, este beneficio inicial desaparece a medio y largo plazo(132), por lo que el tratamiento óptimo sigue siendo motivo de debate, especialmente en pacientes jóvenes, con bajo riesgo para cirugía convencional y anatomía favorable para EVAR, en los que la cirugía convencional puede ser definitiva. En un estudio realizado en nuestro centro en el que se incluyeron 1000 pacientes intervenidos de AAA con ambas técnicas, se estableció, mediante el empleo de curvas ROC que en pacientes menores de 73 años no había diferencia en cuanto a la mortalidad postoperatoria precoz, mientras que el número de reintervenciones durante el seguimiento sí que fue menor. En la serie global, la mortalidad a largo plazo era mayor en el grupo intervenido mediante EVAR, aunque esta mortalidad estaba en relación con la mayor comorbilidad de los pacientes intervenidos mediante esta técnica(133).

## **2. ELEMENTOS CELULARES SANGUÍNEOS RELACIONADOS CON LA INFLAMACIÓN EN LOS AAA**

Como se ha comentado previamente, la inflamación es una característica fisiopatológica central de los AAA, e íntimamente relacionada con la proteólisis y la pérdida de CMLs. Aunque los eventos que inician la fisiopatología de los AAA en humanos siguen siendo desconocidos, existe evidencia de la relación de ciertos elementos celulares con los procesos inflamatorios que se dan en esta patología. A continuación describiremos los dos que más se han relacionado.

### **II.2.1 Plaquetas**

Las plaquetas son un componente celular de la sangre cuya función principal (en conjunto con los factores de la coagulación) es la hemostática. Son fragmentos del citoplasma de los megacariocitos, sus precursores hematopoyéticos que se encuentran en

## INTRODUCCIÓN

la médula ósea, y no poseen núcleo. Tienen una morfología discoide biconvexa, con un tamaño de 2-3  $\mu\text{m}$  cuando no se encuentran activadas(134,135).

### *II.2.1.a Estructura de las plaquetas*

Estructuralmente se pueden dividir en 4 zonas, desde la más periférica hasta la más central:

#### ❖ Zona periférica:

Compuesta por la membrana plasmática, que se encuentra cubierta por un glucocáliz rico en mucopolisacáridos y glicoproteínas (GP) necesarias para la adhesión, activación y agregación. Las más importantes son la GPIb/IX/X; GPVI y la GP IIb/IIIa.

#### ❖ Zona gelatinosa, estructural o trombostenina:

En íntimo contacto con la cara interna de la membrana plaquetaria, está formada por microtúbulos y microfilamentos que mantienen la forma discoide de las plaquetas, y provocan un cambio de forma cuando la plaqueta se activa.

#### ❖ Zona de organelas:

Situada por debajo de la capa de microtúbulos, está compuesta por mitocondrias, partículas de glucógeno y tres tipos de gránulos dispersos en el citoplasma: cuerpos densos (que contienen mediadores no proteicos, como son el ADP, ATP, y otros nucleótidos, compuestos de fosfato, iones de calcio y serotonina), gránulos alfa (contienen proteínas que contribuyen a la hemostasia, así como factor de crecimiento derivado de plaquetas) y gránulos lisosómicos, que contienen varias enzimas.

#### ❖ Zona membranosa:

El sistema canalicular abierto es el lugar de producción del tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), que se secreta a través del sistema canalicular. Existe un segundo tipo de membrana, el sistema canalicular denso, que es uno de los lugares de almacenamiento de calcio iónico.



## INTRODUCCIÓN

### *II.2.1.b Fisiología de las plaquetas*

Para una mejor comprensión del funcionamiento de las plaquetas, y de los procesos que las convierten en un tapón plaquetario hemostático a partir de plaquetas inactivadas, se suele dividir la dinámica plaquetaria en tres fases: adhesión, activación y agregación. Sin embargo, esta división es artificial, ya que estas fases se suceden rápidamente y se mantienen en el tiempo hasta que el estímulo que las produce desaparece, por lo que no son tres fases consecutivas, sino que se solapan entre sí(136).

#### ❖ Adhesión:

Cuando existe una disrupción endotelial, el colágeno y el FvW subendoteliales quedan expuestos a las plaquetas circulantes. El receptor plaquetario GPIb $\alpha$  se une al FvW, iniciándose una unión débil que frena las plaquetas y permite la interacción del colágeno con los receptores plaquetarios GPVI y la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , consolidando la adhesión e iniciando la activación plaquetaria(137).

#### ❖ Activación:

La activación de las plaquetas mediada por la GPVI permite una firme adhesión de las plaquetas y la secreción de las sustancias procoagulantes y proinflamatorias contenidas en ellas, lo que hace que el trombo crezca y se consolide su formación. Las plaquetas adheridas permanecerán vivas durante horas o días en el sitio de lesión vascular y liberarán microvesículas con actividad proinflamatoria y protrombótica, de las cuales se habla más adelante.

#### ❖ Agregación:

Tras la deposición de las plaquetas sobre el FvW y el colágeno, se requiere el reclutamiento de nuevas plaquetas dese la circulación, en un proceso conocido como agregación plaquetaria. Esto es posible por la acumulación local de agonistas de la

## INTRODUCCIÓN

activación de las plaquetas debida a su secreción desde las plaquetas ya adheridas y activadas.

### *II.2.1.c Implicación de las plaquetas en los procesos inflamatorios*

Las plaquetas juegan un papel fundamental en la hemostasia y la prevención del sangrado. Sin embargo, también contribuyen al desarrollo de respuestas inflamatorias e inmunes, mantenimiento de la integridad vascular y curación de lesiones. Son capaces de reclutar leucocitos y células progenitoras en los sitios de lesión de la pared vascular y trombosis, ya que producen, almacenan y liberan factores proinflamatorios, antiinflamatorios y angiogénicos a la circulación. En la actualidad existe suficiente evidencia como para considerar las plaquetas una parte importante de los procesos inmunes e inflamatorios:

- ❖ Cuando es estimulada por la trombina, la plaqueta secreta más de 300 tipos de proteínas, muchas de ellas relacionadas con reacciones inflamatorias(138).
- ❖ Además de la liberación de sustancias bioactivas, se producen cambios en la composición de la membrana plaquetaria, resultando en la expresión de P-selectina y de GPIIb/IIIa. La expresión de P-selectina es especialmente importante en la interacción de la plaqueta con los leucocitos, así como con el complemento (mediante su unión al factor C3b)(139).
- ❖ La GPIb $\alpha$  es el receptor más conocido de la proteína Mac-1, localizada en los leucocitos activados. La unión entre GPIb $\alpha$  y Mac-1 (plaqueta-leucocito) es de gran importancia en la respuesta inflamatoria mediada por plaquetas(140).
- ❖ A pesar de ser células enucleadas, son capaces de sintetizar proteínas mediante mecanismos únicos y extranucleares de traslación del mRNA

## INTRODUCCIÓN

dependientes de diferentes estímulos o señales(141). Entre otras proteínas, la plaqueta puede sintetizar componentes directamente implicados en los procesos inflamatorios, como son la IL-1 $\beta$ (142), MMP-9 (ambos de gran importancia en la fisiopatología de los AAA, como vimos previamente), otras quimioquinas (RANTES, PF4) o el CD40L(70), también mencionado previamente.

- ❖ Pueden interactuar con patógenos bacterianos e incluso expresar receptores del complemento(143).
- ❖ Expresan y almacenan proteínas antibacterianas llamadas trombocidinas(144).

### *II.2.1.d Interacción de la plaqueta con distintos tipos celulares*

Las plaquetas, a través de su interacción con las células endoteliales y con los leucocitos, pueden favorecer la aparición de un infiltrado inflamatorio en la pared vascular. Además pueden iniciar una respuesta inflamatoria, así como estimular la producción de MMP.

#### *II.2.1.d.i Células endoteliales:*

En condiciones fisiológicas se ha considerado que las plaquetas no se activan ni interactúan con el endotelio intacto, ya que normalmente las CE controlan la reactividad plaquetaria a través de señales inhibitorias. Sin embargo, un endotelio inflamado adquiere propiedades que permiten la interacción con la plaqueta. Y, al contrario, estudios *in vitro* han demostrado cómo las plaquetas activadas son capaces de interactuar con el endotelio intacto(145,146).

Estudios *in vivo* parecen demostrar que las plaquetas podrían intervenir en el desarrollo de la disfunción endotelial. La adhesión de plaquetas al endotelio acontece

## INTRODUCCIÓN

incluso cuando existe un alto estrés de cizallamiento, aunque no exista lesión en la pared vascular(147–149). Se ha demostrado que las plaquetas liberan diferentes agonistas, como la serotonina, el ADP y el ATP, que estimulan la producción de óxido nítrico (NO), en los momentos iniciales y de forma transitoria. Sin embargo, en exposiciones prolongadas se produce el efecto contrario: disminuyen la capacidad del endotelio de liberar NO, favoreciendo la disfunción endotelial. Se desconoce el mecanismo exacto por el que producen este efecto, pero la IL-1 $\beta$  parece tomar gran importancia en él. De hecho, esta IL es uno de los mediadores más potentes en la interacción de la plaqueta activada con el endotelio(150). Adicionalmente, estudios in vitro han demostrado que la coincubación de CE con plaquetas activadas con trombina inducen la secreción de IL-6, IL-8, MCP-1 por parte de las células endoteliales a través de un mecanismo mediado por IL-1 $\beta$  plaquetaria(151). La IL-1 $\beta$  no sólo es capaz de modificar la liberación de factores quimiotácticos por el endotelio, sino que además puede incrementar la expresión de moléculas de adhesión como la ICAM-1 y la  $\alpha_v\beta_3$ , promoviendo la adhesión de neutrófilos y monocitos al endotelio(152). Asimismo, existen estudios que demuestran que las plaquetas pueden inducir cambios en el citoesqueleto y en el metabolismo de los hidratos de carbono de las células endoteliales(153).

### *II.2.1.d.ii Leucocitos*

Las plaquetas activadas promueven el reclutamiento de leucocitos mediante una interacción física con éstos y con el endotelio, que permite su unión, activación leucocitaria, adhesión firme y la posterior infiltración de células inflamatorias en la pared celular(154). Esta interacción puede realizarse de dos formas: Al unirse las plaquetas a los leucocitos se produce en éstos una activación de receptores para la adhesión a la pared vascular; y por otro lado, las plaquetas pueden ejercer como puente entre el endotelio y los leucocitos previa adhesión de éstas a la pared vascular. Las selectinas son una familia

## INTRODUCCIÓN

de proteínas de membrana que intervienen en los estadios iniciales de la interacción, siendo la P-selectina la que representa un papel fundamental en el contacto plaqueta-leucocito(155). Uno de los principales mediadores del reclutamiento de monocitos es RANTES, ya que se ha demostrado que actúa como iniciador del arresto de los leucocitos en el endotelio(156) mediado por P-selectina(157).

El receptor CD40 se expresa en varios grupos celulares, como plaquetas, células B maduras y algunos linfocitos T<sub>c</sub> y T<sub>h</sub>. Las plaquetas activadas liberan CD40L, que modula principalmente la respuesta inmune mediada por linfocitos T y B. También promueve en el endotelio la liberación de IL-8 y MCP-1 y la expresión de receptores de adhesión para monocitos y linfocitos. Las plaquetas también pueden verse activadas por el CD40L, tanto su forma soluble como el expresado por los linfocitos T, y en ellas induce la expresión de P-selectina y la liberación de RANTES, lo que induce la adhesión de mononucleares al endotelio(157,158). En relación con los AAA, la activación de los monocitos mediante el CD40L, induce la expresión de MMP (especialmente MMP-9)(159), que juegan un importantísimo papel en la fisiopatología de los AAA.

### II.2.2 Células mononucleares

Las células mononucleares son aquéllas que se encuentran presentes en la sangre periférica, y que poseen un único núcleo redondeado. Se trata fundamentalmente de linfocitos (que a su vez se clasifican en linfocitos T, linfocitos B y NK (del inglés *natural killers*), y de monocitos. Los granulocitos son otro tipo de leucocitos que poseen un núcleo multilobulado, y las plaquetas y los eritrocitos, son elementos sanguíneos no nucleados.

## INTRODUCCIÓN

### *II.2.2.a Clasificación y funciones de las células mononucleares*

#### *II.2.2.a.i Linfocitos*

Los linfocitos son células redondas y con un gran núcleo en su interior. Suponen entre el 23 y el 35% de los leucocitos en sangre periférica.

Linfocitos T:

Los linfocitos T forman parte de la inmunidad adquirida, y junto con los linfocitos B, son su principal componente. Los linfocitos T median la respuesta inmune celular. En ambos casos (linfocitos T y B), su función es la de reconocer un antígeno específico de esa célula mediante un proceso denominado presentación antigénica (mediado por el complejo mayor de histocompatibilidad clase II o clase I), y de este modo poner en marcha los mecanismos para combatirlo.

En el caso de los linfocitos T, existen dos principales poblaciones con funciones distintas:

Los **linfocitos T<sub>h</sub> (T helper)**, producen una serie de citoquinas que dirigen la respuesta inmune, activando otros grupos celulares. Son las responsables de la maduración de los linfocitos B hacia células plasmáticas, de la activación de los linfocitos T<sub>c</sub>, y de los macrófagos. Se activan mediante la presentación antigénica a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, sólo presente en células presentadoras de antígenos, como son las células dendríticas o los macrófagos. Una vez activadas, se replican rápidamente y secretan distintas citoquinas, pudiendo diferenciarse hacia diferentes subtipos, que generaran distintos tipos de respuestas inmunes (ver más adelante). En su membrana celular expresan CD4.

## INTRODUCCIÓN

Los **linfocitos T<sub>c</sub> (T citotóxicos)**, poseen unos gránulos citotóxicos con los que inducen la muerte celular de células propias infectadas por virus o células tumorales. Los antígenos son presentados a estas células a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, presente en todas las células nucleadas. No obstante, para actuar sobre las células infectadas, necesitan haber sido previamente activadas por linfocitos T<sub>h</sub>, a través de una respuesta T<sub>h</sub>1. En su membrana celular expresan CD8.

### Linfocitos B:

Al igual que los linfocitos T, forman parte de la inmunidad adquirida, y por lo tanto su respuesta también es antígeno-específica, y se inicia tras la presentación antigénica, aunque a diferencia de los linfocitos T, los linfocitos B son los principales implicados en la respuesta inmune humoral. En el caso de los linfocitos B, la forma de combatir el estímulo antigénico es la generación de anticuerpos específicos para dicho antígeno, tras su activación a célula plasmática. Esta activación está mediada por linfocitos T<sub>h</sub>, concretamente a través de una respuesta T<sub>h</sub>2. Además, actúan como células presentadoras de antígeno (poseen el complejo mayor de histocompatibilidad clase II), pudiendo activar a los linfocitos T<sub>H</sub>.

### Células NK:

Las células NK forman parte del sistema inmune innato, y al igual que las células T<sub>c</sub>, inducen muerte celular de células propias infectadas por agentes patógenos o células tumorales. Sin embargo, y a diferencia de éstas, no es una respuesta específica contra un solo antígeno, sino que pueden inducir la muerte celular a cualquier célula afectada (en la que la infección o tumor haya producido cambios en la membrana, fundamentalmente en el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I).

## INTRODUCCIÓN

### *II.2.2.a.ii Monocitos*

Los monocitos son las células más grandes dentro de los leucocitos, tienen forma ameboidea con un núcleo en su interior con forma elipsoidal. Suponen entre el 2 y el 10% de los leucocitos en sangre periférica. Aunque forman parte del sistema inmune innato, tienen una gran influencia en el sistema inmune adquirido.

Entre sus múltiples funciones, cabe destacar: su diferenciación a macrófagos o células dendríticas en respuesta a señales inmunes, la migración, en respuesta a señales inflamatorias, a tejidos infectados, y la reposición de macrófagos residentes en tejidos bajo condiciones fisiológicas.

Una vez activados y transformados a macrófagos o células dendríticas, sus 3 principales funciones son las de fagocitosis, presentación de antígenos y producción de citoquinas. Las citoquinas típicamente producidas por los macrófagos son la IL-1; IL-12 y el TNF $\alpha$ .

### *II.2.2.b Activación linfocitaria y tipos de respuesta inmune*

Tras la activación de los linfocitos T<sub>h</sub>, éstos producen IL-2, que provoca, en primer lugar una respuesta autocrina que favorece la proliferación de los mismos. También se produce una respuesta paracrina sobre linfocitos T<sub>h</sub> próximos. El estímulo de activación junto con el de proliferación, transforma a los linfocitos T<sub>h</sub>, en linfocitos T<sub>h0</sub>, que liberan IL-2, IL-4 e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). En función de la predominancia de citoquinas en el ambiente, los linfocitos T<sub>h0</sub> se diferenciarán hacia linfocitos T<sub>h1</sub> o linfocitos T<sub>h2</sub>:

Respuesta T<sub>h1</sub>:

La citoquina principal en este tipo de respuesta es el IFN- $\gamma$ . Entre sus efectos se encuentran los siguientes:



## INTRODUCCIÓN

- ❖ Diferenciación de los linfocitos  $T_h0$  hacia linfocitos  $T_h1$ , con la consecuente generación de más  $IFN-\gamma$ , produciéndose una retroalimentación positiva que lleva al establecimiento de la respuesta  $T_h1$ .
- ❖ Activación de linfocitos  $T_c$ , induciendo una respuesta inmune celular.
- ❖ Activación de macrófagos, con incremento de su actividad fagocitaria y de sus lisosomas.
- ❖ Aumenta la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I en todas las células, y del tipo II en las células presentadoras de antígeno.
- ❖ Aumento de ERO a través de la activación de la óxido nítrico sintasa.
- ❖ Promueve la adhesión y migración leucocitaria.
- ❖ Induce la producción de inmunoglobulina tipo G2a y G3 en las células plasmáticas.
- ❖ Inhibe la diferenciación de los linfocitos  $T_h0$  hacia linfocitos  $T_h2$ .

Así, las principales citoquinas de la respuesta  $T_h1$ , son el  $INF-\gamma$ , y el  $TNF-\beta$ , y sus células efectoras son, sobre todo, los linfocitos  $T_c$  y los macrófagos. Como hemos visto previamente, este tipo de respuesta es la que predomina en las fases iniciales del proceso inflamatorio en los AAA. La activación de las diferentes líneas celulares lleva a la producción de distintas citoquinas. En relación con los AAA, es interesante que la activación de los macrófagos, lleva a una producción de  $IL-1\beta$  (de hecho son los macrófagos la principal fuente de  $IL-1\beta$  en la aorta(160)) y  $TNF-\alpha$  que estimulan la producción de MMP-9 en distintos tipos celulares(161), entre ellos las células musculares lisas(162).

### Respuesta $T_h2$ :

La citoquina principal en este tipo de respuesta es la  $IL-4$ , cuyos efectos son los siguientes:

## INTRODUCCIÓN

- ❖ Diferenciación de los linfocitos  $T_h0$  hacia linfocitos  $T_h2$ , con la consecuente generación de más IL-4, produciéndose una retroalimentación positiva que lleva al establecimiento de la respuesta  $T_h2$ .
- ❖ Activación de linfocitos B hacia células plasmáticas, induciendo una respuesta inmune humoral.
- ❖ Induce la producción de inmunoglobulina tipo E en las células plasmáticas.
- ❖ Inhibe la diferenciación de los linfocitos  $T_h0$  hacia linfocitos  $T_h1$ .

Otras citoquinas que se producen son la IL-5, que activa los eosinófilos, y la IL-10, que también suprime los linfocitos  $T_h1$ , mediante la inhibición de IFN- $\gamma$  y de la IL-2.

Así la principal citoquina en la respuesta  $T_h2$  es la IL-4, y sus principales células efectoras son las células plasmáticas, así como los eosinófilos.

### 3. METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR

El metabolismo energético es el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en una célula con tres fines: obtención de energía, síntesis de biomoléculas funcionales y estructurales a partir de precursores simples y transporte activo de moléculas e iones. Estas reacciones están interrelacionadas de forma compleja y se clasifican en:

- a) Reacciones catabólicas: aquéllas en las que se obtiene energía a partir de la degradación de sustancias complejas.
- b) Reacciones anabólicas: aquéllas que requieren energía para producir moléculas orgánicas complejas.

## INTRODUCCIÓN

La principal fuente de energía celular es la glucosa. La energía de esta molécula se obtiene a través de una ruta conocida como glucólisis, que constituye la ruta metabólica inicial del catabolismo de los hidratos de carbono.

### II.3.1 Glucólisis. Formación de piruvato

Esta vía se compone de 10 reacciones que de forma global transforman una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, generando dos moléculas de ATP (adenosin trifosfato) por cada piruvato.

El ATP está formado por una base nitrogenada (adenina), unida al carbono 1 de la pentosa ribosa con tres grupos fosfato en el carbono 3. Posee dos enlaces anhídrido de alta energía y la hidrólisis de uno de ellos libera 31 KJ/mol, transformándolo en ADP. El ATP es considerado la principal moneda energética en el metabolismo celular.

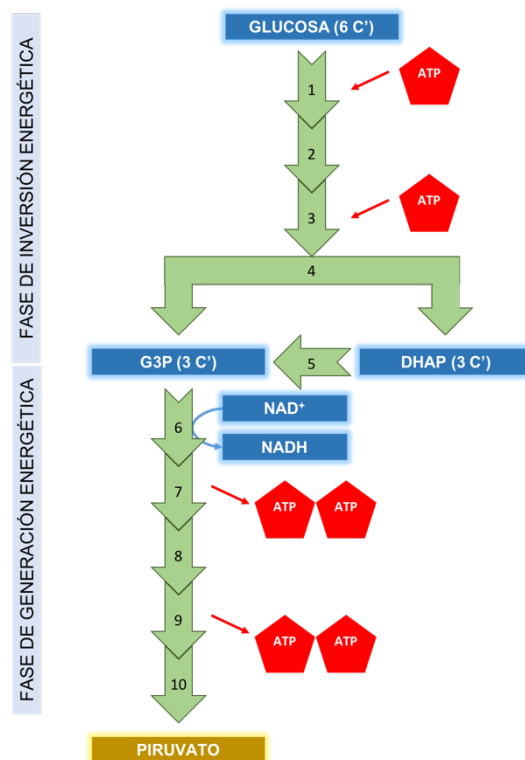


Figura II.4: Esquema de las reacciones incluidas en la glucólisis: En las reacciones 1-3 se produce una fosforilización que requiere inversión de ATP. En las reacciones 4 y 5 se produce la fragmentación de una molécula de 6 carbonos en dos moléculas de 3 carbonos. En las reacciones 6-10 se genera energía obteniendo 4 moléculas de ATP por cada molécula de 3 carbonos. C': carbono. G3P: gliceraldehído-3-fosfato. DHAP: dihidroxiacetona fosfato. ATP: adenosin trifosfato.

## INTRODUCCIÓN

La glucólisis supone el primer paso de la oxidación completa de la glucosa en  $\text{CO}_2$  y agua y tiene lugar en el citosol celular. Estas diez reacciones, anaerobias, se agrupan en dos fases distintas, esquematizadas en la Figura II.4.

En la primera fase, de inversión energética, la glucosa se activa metabólicamente por fosforilación (se utilizan 2 moles de ATP por cada mol de glucosa metabolizado). Este proceso da lugar a un azúcar fosforilado de 6 carbonos, la fructosa-1,6-bisfosfato, que se fragmenta para dar 2 moles de triosa fosfato: gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Ésta última es transformada a G3P posteriormente para poder continuar la ruta glucolítica completa.

En la segunda fase, de generación energética, el G3P se activa más para dar compuestos de alta energía: primero el 1,3-bisfosfoglicerato y luego el fosfoenolpiruvato. Cada uno de estos compuestos es capaz de transferir su fosfato al ADP generando ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato. Se generan por lo tanto, 2 moles de ATP por cada mol de triosa fosfato metabolizado, y dado que por cada mol de glucosa se obtienen 2 moles de triosa fosfato, en global se obtienen 4 moles de ATP por cada mol de glucosa metabolizado. Tras la cesión del grupo fosfato por parte del fosfoenolpiruvato en la última reacción de la glucólisis, se obtiene piruvato.

### II.3.2 Destinos metabólicos del piruvato

El piruvato obtenido tras la glucólisis constituye el punto central de ramificación metabólica. Su destino se encuentra subordinado al estado de oxidación de la célula, relacionado con la primera reacción de la segunda fase de la glucólisis que es catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. En esta reacción se obtiene NADH que debe reoxidarse a  $\text{NAD}^+$  para poder continuar la glucólisis.

En condiciones aerobias, como veremos más adelante, el NADH se oxida (pierde electrones) mediante la cadena de transporte electrónico mitocondrial donde los

## INTRODUCCIÓN

electrones se transfieren finalmente al oxígeno. Antes de ello, el piruvato se transforma en acetil-coenzimaA (acetil-CoA) que es oxidado en el ciclo del ácido cítrico o tricarboxílico, donde se obtiene además ATP y más NADH para obtención de energía en la cadena respiratoria. En condiciones anaerobias, el NADH generado no puede reoxidarse a tasas comparables en las mitocondrias. En estos casos, el NADH impulsa la reducción del piruvato a lactato produciéndose el  $\text{NAD}^+$  necesario para continuar la glucólisis (ver figura II.5).

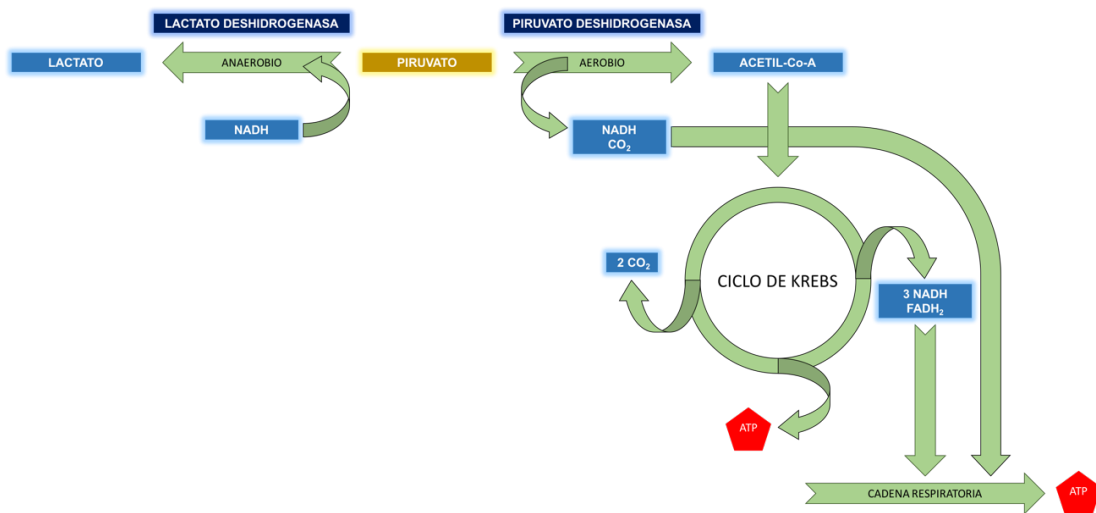


Figura II.5: Esquema de las rutas metabólicas a partir del piruvato.

### II.3.3 Vía metabólica aerobia. Metabolismo oxidativo: respiración

La oxidación metabólica constituye un proceso de tres etapas que tienen lugar en la mitocondria. Esta organela está formada por una membrana externa, una membrana interna, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana interna, donde tiene lugar la cadena respiratoria, se pliega a su vez generando las crestas proyectadas hacia el interior de la mitocondria.

## INTRODUCCIÓN

### *II.3.3.a Transformación del piruvato en acetil-coA*

La reacción global comporta pérdida del grupo carboxilo del piruvato en forma de  $\text{CO}_2$ , la reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  (mediante la oxidación del piruvato) y la activación metabólica de los dos carbonos restantes del piruvato, generando un fragmento activado de dos carbonos (grupo acetilo de la acetil-CoA). Es una reacción muy exergónica y por lo tanto in vivo es irreversible. Es catalizada por un complejo de tres enzimas, denominado complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), y cinco coenzimas que incluyen el  $\text{NAD}^+$  y la coenzima A.

### *II.3.3.b Ciclo del ácido cítrico / Ciclo tricarboxílico / Ciclo de Krebs*

Esta segunda etapa constituye la oxidación completa de los dos carbonos de la acetil-CoA que son liberados en forma de  $\text{CO}_2$ . Asimismo, se generan cofactores reducidos ( $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$ ) y un mol de ATP por cada mol de CoA que entra en el ciclo (ver figura II.6). De forma análoga a lo que sucede en la glucólisis, podemos distinguir dos fases:

#### Reacciones 1-4: Incorporación y pérdida de dos átomos de carbono

- ❖ **Reacción 1. Introducción de dos átomos de carbono en forma de acetil-CoA.** El grupo acetilo de la acetil-CoA es cedido al oxalacetato, que es transformado a un ácido tricarboxílico de 6 carbonos, el citrato. Esta reacción es catalizada por la citrato sintasa, es muy exergónica y supone un lugar de regulación para el conjunto de la ruta.
- ❖ **Reacción 2. Isomerización del citrato.** El citrato es isomerizado mediante migración de su grupo hidroxilo alcohol terciario, para que pueda ser oxidado en las siguientes reacciones. Así, mediante una reacción de deshidratación e hidratación sucesivas, la enzima aconitasa transforma el citrato en isocitrato.

## INTRODUCCIÓN

- ❖ **Reacción 3. Generación de CO<sub>2</sub> por una deshidrogenasa ligada a NAD<sup>+</sup>.** La primera de las dos descarboxilaciones es catalizada por la isocitrato deshidrogenasa. Se cede un átomo de hidrógeno al grupo NAD<sup>+</sup> generando NADH y una molécula inestable que se descarboxila espontáneamente, liberando CO<sub>2</sub> y transformándose a  $\alpha$ -cetoglutarato.
- ❖ **Reacción 4. Generación de un segundo CO<sub>2</sub> por un complejo multienzimático.** En una reacción similar a la producida por el complejo lactato deshidrogenasa, en la que intervienen los mismos coenzimas, el  $\alpha$ -cetoglutarato experimenta una descarboxilación oxidativa en la que interviene el CoA. Como resultado, se produce un mol de CO<sub>2</sub>, un mol de NADH y un mol de succinil-CoA.

En este punto se ha vuelto a una molécula de 4 carbonos (succinil-CoA), tras haber incorporado 2 carbonos al oxalacetato (también de 4 carbonos). La siguiente etapa del ciclo de Krebs consiste en la reposición de oxalacetato a partir de succinil-CoA para poder continuar incorporando y oxidando carbonos procedentes de la acetil-CoA.

### Reacciones 5-8: Regeneración de oxalacetato:

- ❖ **Reacción 5. Fosforilación a nivel de sustrato.** La succinil-CoA es una molécula de elevada energía que permite generar un nucleósido trifosfato (ATP o GTP) incorporando fosfato inorgánico. El CoA se libera de la molécula en esta reacción, dando lugar a succinato.
- ❖ **Reacción 6. Deshidrogenación dependiente de flavina.** Se produce una deshidrogenación de los dos carbonos saturados del succinato, que pasan a estar unidos por un doble enlace. Esta reacción es catalizada por la succinato deshidrogenasa, que cede los dos hidrógenos a un coenzima redox más potente, como es la FAD, que se transforma en FADH<sub>2</sub>, y que

## INTRODUCCIÓN

tendrá que ser reoxidado a FAD en la cadena transportadora de electrones (en una reacción, por tanto, dependiente de oxígeno).

❖ **Reacción 7. Hidratación del doble enlace carbono-carbono.** La enzima fumarato hidratasa (conocida como fumarasa), realiza una hidratación *trans* estereoespecífica del doble enlace generado en la reacción previa, generando L-malato.

❖ **Reacción 8. Deshidrogenación que regenera el oxalacetato.** Finalmente, en una reacción nuevamente dependiente de NAD, se transforma el L-malato a oxalacetato mediante deshidrogenación. Esta reacción es catalizada por la malato deshidrogenasa (MDH), y genera una molécula de NADH, que se debe reoxidar en la cadena transportadora de electrones.

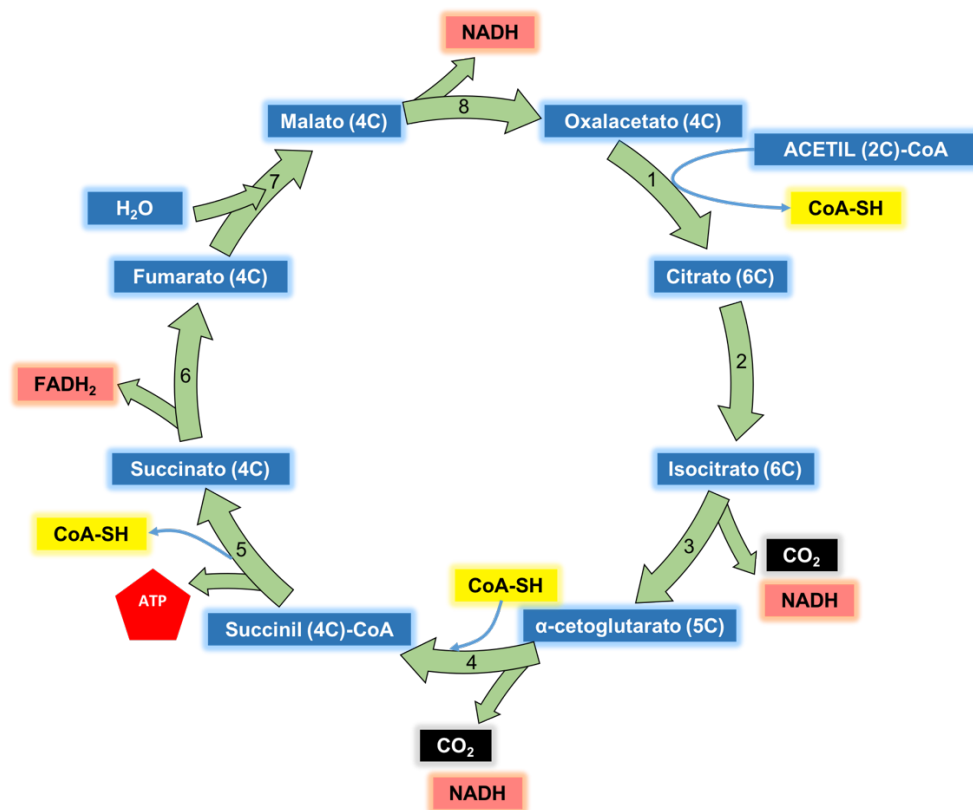


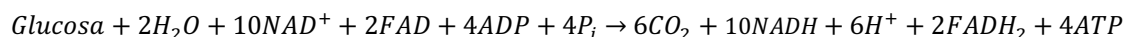
Figura II.5: Esquema de las reacciones metabólicas del ciclo de Krebs. Se incluye el número de carbonos de cada molécula. Obsérvese que en la reacción 1 se incorporan 2 carbonos a partir del grupo acetilo del acetil-CoA, que son eliminados mediante descarboxilación en las reacciones 3 y 4.



## INTRODUCCIÓN

### *II.3.3.c Transporte electrónico y fosforilación oxidativa*

El balance global de la glucólisis, con producción de dos moléculas de piruvato, junto con la oxidación de cada una de ellas en el ciclo de Krebs puede resumirse en la siguiente ecuación:



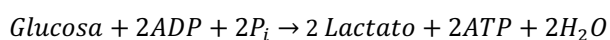
Como se puede observar, la producción de ATP por mol de glucosa metabolizada no aumenta significativamente respecto a la glucólisis aislada, puesto que la mayor parte del ATP es generado en condiciones aerobias a partir de la reoxidación de los transportadores electrónicos reducidos (NADH y FADH<sub>2</sub>) en la cadena respiratoria y posterior fosforilación oxidativa, con un balance final de 38 moles de ATP tras la oxidación completa de 1 mol de glucosa.

Las proteínas de la cadena respiratoria, localizadas en la membrana interna mitocondrial son proteínas transportadoras, entre las que destacan los citocromos, ensamblados en 5 complejos multiproteicos (I, II, III, IV, V) de los cuales los 4 primeros generan un gradiente eléctrico transportando protones (H<sup>+</sup>) hacia la parte externa de la membrana, con la energía obtenida de la oxidación de los distintos transportadores electrónicos, hasta el receptor final de electrones, que es el oxígeno. El complejo V, también denominado ATP sintasa-complejo F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>, supone el paso final con la síntesis de ATP a partir del ADP, un grupo fosfato y de la energía suministrada por el flujo de protones al volver a entrar a través de la membrana a favor de gradiente eléctrico. La disponibilidad de ADP es el principal mecanismo regulador de esta reacción.

## INTRODUCCIÓN

### II.3.4 Vía metabólica anaerobia. Metabolismo del lactato

La enzima que cataliza la reducción de piruvato en lactato es la lactato deshidrogenasa (LDH), que utiliza una molécula de NADH (cuando este no puede ser utilizado en la cadena respiratoria por ausencia de oxígeno como receptor final de los electrones). Esta reacción supone una fermentación, definida como ruta metabólica productora de energía que no comporta un cambio neto del estado de oxidación (el NADH obtenido durante la glucólisis se usa para reducir el piruvato a lactato, por lo que no existe cambio en el estado de oxidación entre la glucosa y el lactato). El balance global de la glucólisis, junto con la reducción del piruvato a lactato, se puede resumir en la siguiente ecuación:



Dado que no existe producción neta de NADH, esta ruta metabólica no genera más ATP que 2 moles por mol de glucosa metabolizado, siendo mucho menos eficiente que la ruta aerobia.

En los vertebrados, algunos tejidos obtienen la mayor parte de su energía a partir del metabolismo anaerobio, tales como los eritrocitos o el músculo esquelético cuando la necesidad de generar energía supera la capacidad de oxidar el piruvato producido en la glucólisis. Tradicionalmente se pensaba que la formación de lactato en el músculo esquelético era consecuencia del metabolismo anaerobio, pero estudios metabólicos como el análisis por RMN con  $^{31}\text{P}$  sugieren que el lactato es un producto intermediario y no una vía metabólica muerta, a partir de los datos que sugieren que, incluso en un tejido muscular completamente oxigenado, un 50% de la glucosa metabolizada se convierte en lactato, pudiendo constituir una forma de coordinar las rutas de almacenamiento y generación de energía en los tejidos(163).

### 4. CULTIVOS EN MEDIOS CONDICIONADOS

Un medio condicionado (MC) se define como un medio de cultivo que contiene sustancias biológicamente activas, obtenidas previamente por cultivos celulares o tisulares que han liberado al medio dichas sustancias, capaces de afectar ciertas funciones celulares.

Su concepto nace a raíz de estudios sobre cultivos celulares en los años 50. Se había observado previamente que existe una cantidad de inóculo óptima para el crecimiento del cultivo celular. Esto se debe a que las propias células adecuan el medio para su supervivencia, y así, inóculos muy pequeños no consiguen adecuar el medio correctamente, e inóculos muy grandes no consiguen la cantidad suficiente de nutrientes y otras sustancias generadas en el medio para que todas las células pudieran sobrevivir. En el estudio de Pace y Aftonomos(164), se conseguía, por primera vez, demostrar que al añadir un medio condicionado previamente por células hepáticas humanas se aumentaba la tasa de crecimiento celular en los cultivos de células de la misma línea, y se disminuía la cantidad de inóculo umbral para la viabilidad del cultivo.

Posteriormente Takahashi y Okada(165), realizaron un estudio sobre el efecto de los medios condicionados, concluyendo que la respuesta celular dependía del tipo de tejido que condiciona el medio, del tiempo que ha estado el tejido condicionando el medio, de la fase del tejido que condiciona el medio y de la síntesis de colágeno. En este estudio utilizaron medios condicionados por células distintas de las que se cultivarían posteriormente.

En las últimas décadas el uso de medios condicionados se ha ampliado y va más allá de aumentar la supervivencia de los cultivos celulares. Por un lado, existe la posibilidad de condicionar un medio y posteriormente analizar las sustancias que se han liberado al mismo (comparando dos condiciones distintas del medio de cultivo). Por otro

## INTRODUCCIÓN

lado, se puede condicionar un medio, y cultivar en él un tejido para estudiar los efectos biológicos (más allá del crecimiento celular) que tiene ese medio sobre el tejido. Esto nos permite exponer tejidos a sustancias desconocidas pero que pueden tener un efecto biológico sobre los mismos, al igual que en los estudios iniciales sobre medios condicionados, cuando no se conocían las sustancias que condicionaban el medio para conseguir un mayor crecimiento celular, pero se conseguía dicho efecto. Esas sustancias pudieron ser identificadas posteriormente, tras conocer su efecto.

### **II.4.1 Uso de cultivos en medios condicionados para el estudio de los AAA**

Son escasos los estudios encontrados en la literatura que usan los cultivos en MC para estudiar la fisiopatología de los AAA(32,166–176) (ver tabla II.1). En todos ellos se han cultivado distintos tipos celulares (CML, CE y monocitos), y la mayoría estudian efectos en procesos inflamatorios (167,168,170–173,175,176), aunque también se han inducido cambios genéticos(174), en la síntesis de colágeno(166), y apoptóticos(32,168). No hemos encontrado ningún estudio que analice otros aspectos importantes de la fisiopatología de los AAA, como son el metabolismo energético o el estado de estrés oxidativo.

Autor	Año	Medio condicionado	Célula cultivada	Efectos
Minion(166)	1993	MC-AAA MC-Aorta Sana MC-Aorta Patología Oclusiva	CML	Inducción expresión procolágeno en MC-AAA
Szekanecz (167)	1994	MC-AAA MC-Aorta Sana	CE	Inducción de expresión de moléculas quimiotáticas en MC-AAA
Walton(168)	1999	MC-Capa media AAA MC-Macrófagos AAA MC-CML sanas (control)	CML-AAA CML sanas CEVS	Los MC inhibían la síntesis de ADN e inducían apoptosis en CML sanas y CML-AAA (más efecto en las segundas). No tenían este efecto sobre las CE de vena safena. Además, el efecto se inhibía al añadir indometacina al medio.
Liao(169)	2000	MC-CML-AMI MC-CML-AAA	CML-AAA CML-AMI	No se observaron cambios en la tasa de crecimiento de las CML de AMI condicionadas por CML de AAA ni viceversa.
Liu(170)	2003	MC-Linfocitos activados MC-Monocitos activados (macrófagos) Medio control (Medio-199)	CML	Inducción de producción de MMP-2, que se inhibía con dosis crecientes de doxícilina.
Fontaine(32)	2004	MC-Trombo AAA capa luminal MC-Trombo AAA capa intermedia MC-Trombo AAA capa abluminal	CML CEMO	Inducción de apoptosis, e inhibición de crecimiento, adhesión y colonización en el trombo luminal respecto a las otras dos capas.
Houard(171)	2009	MC-Trombo AAA capa luminal MC-Trombo AAA capa abluminal Medio control (RPMI)	Neutrófilos	Los MC inducen quimiotaxis de neutrófilos, que se inhiben bloqueando RANTES e IL-8.
Oya(172)	2011	MC-Monocitos bajo estiramiento cíclico + hipoxia MC-Monocitos bajo estiramiento cíclico MC-Monocitos bajo hipoxia MC-Monocitos	CML	Inducción de producción de MMP-9 bajo hipoxia y estiramiento cíclico. Inducción de IL-6, TNF $\alpha$ y apoptosis en CML, bajo estiramiento cíclico, tanto en hipoxia como en normoxia (la apoptosis es máxima en hipoxia).
Blomkalns (173)	2013	MC-Fibroblastos adventiciales aórticos (FAAo) MC-Tejido adiposo perivascular (TAPV) Medio control (LAM y MCP-1)	Monocitos	Inducción de producción de CD14 Inducción de migración monocitaria dependiente de CD14
Biros(174)	2014	MC-Monocitos/Macrófagos Medio control (DMEM + 10% FBS)	CML	Inducción de delección LINE1 [Cromosoma 6 (q22.1-23.2)].
Guedj(175)	2014	MC-media AAA; MC-adventicia AAA MC-media Aorta Sana; MC-adventicia Aorta Sana	CMSP	Inducción de quimiotaxis de linfocitos B por MC-Adventicia AAA y de linfocitos T por MC-adventicia AAA y MC-media AAA.
Rubio-Navarro(176)	2015	MC-Adventicia AAA MC-Aorta Sana	Monocitos	Inducción de expresión de moléculas quimiotáticas

Tabla II.1: Resumen de los distintos estudios que han empleado cultivos celulares en medios condicionados para el estudio de AAA. MC: Medio condicionado; AAA: Aneurisma de aorta abdominal; CML: Células musculares lisas; CEVS: Células endoteliales de vena safena; AMI: Arteria mesentérica inferior; CEMO: Células estromales de médula ósea; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; FBS: Fetal bovine serum; CMSP: células mononucleares de sangre periférica.





### III. HIPÓTESIS





### III HIPÓTESIS

La etiopatogenia de los aneurismas de aorta abdominal (AAA) continúa siendo un motivo de discusión a día de hoy. A pesar de los avances conseguidos en la comprensión de los distintos mecanismos que intervienen en la degeneración aneurismática de la aorta, todavía existen diversas teorías acerca de su fisiopatología, sin que ninguna explique completamente cómo se produce esta degeneración.

Por otro lado, tampoco se ha identificado la causa primera que desencadena el resto de los eventos que llevarán a la pérdida de células musculares lisas y matriz extracelular, y que provocan una intensa reacción inflamatoria que conlleva a la dilatación arterial. El conocer esta causa tiene un interés capital, ya que podría suponer una diana terapéutica para una patología con una elevada mortalidad, que en la actualidad sólo responde al tratamiento quirúrgico, no exento de complicaciones.

Esta causa se ha buscado históricamente en la propia pared de la aorta, aunque, como hemos visto previamente, existen otras células que intervienen en la formación de los AAA, y por lo tanto, en ellas podría residir la causa primera que inicie el resto de los eventos fisiopatológicos.

Por tanto, la hipótesis planteada es que los medios condicionados con plaquetas, células mononucleares o tejido aneurismático podrían inducir los cambios iniciales de la fisiopatología de los AAA en tejido aórtico sano, aportando así información acerca de cuál de estos tejidos es el responsable del inicio de la degeneración aneurismática.



## IV. OBJETIVOS



## IV OBJETIVOS

Los objetivos principales de la presente tesis son:

1. Analizar si medios condicionados con tejido aórtico aneurismático, células mononucleares y plaquetas de pacientes con AAA inducen la producción de IL-6 e IL-1 $\beta$ , citoquinas características de los AAA, en tejido aórtico sano.
2. Estudiar la influencia que ejercen sobre tejido aórtico sano los medios condicionados con tejido aórtico aneurismático, células mononucleares y plaquetas de pacientes con AAA sobre la producción de CD40L, marcador de riesgo cardiovascular y molécula clave para la función inflamatoria de las plaquetas.
3. Analizar el efecto de los medios condicionados por tejido aórtico aneurismático, células mononucleares y plaquetas de pacientes con AAA sobre el estado de estrés oxidativo del tejido aórtico sano, a través de la cuantificación de gp91phox.
4. Determinar si medios condicionados con tejido aórtico aneurismático, células mononucleares y plaquetas de pacientes con AAA influyen en la producción y/o actividad de MMP-9, la metaloproteinasa más específica de los AAA, en tejido aórtico sano.
5. Estudiar la actividad de la lactato deshidrogenasa, enzima clave para la continuación del metabolismo de la glucosa hacia vías anaerobias, tras exposición de tejido aórtico sano a medios condicionados con tejido aórtico aneurismático, células mononucleares y plaquetas de pacientes con AAA.

## OBJETIVOS

6. Determinar si la expresión de la malato deshidrogenasa, enzima clave en el ciclo de Krebs y representativa de la actividad de esta ruta, que se da en condiciones aeróbicas, se modifica tras exposición de tejido aórtico sano a medios condicionados con tejido aórtico aneurismático, células mononucleares y plaquetas de pacientes con AAA.
7. Examinar el efecto de medios condicionados con tejido aórtico, células mononucleares y plaquetas de pacientes con AAA sobre el metabolismo de los hidratos de carbono en tejido aórtico sano, mediante la determinación de lactato y piruvato en dichos tejidos.







## V. MATERIAL Y MÉTODO



### V MATERIAL Y MÉTODO

La presente tesis parte de la obtención de muestras de aorta, plaquetas y células mononucleares en pacientes portadores de AAA, para crear medios de cultivo condicionados (MC-AAA, MC-M y MC-P); y de la obtención de muestras aórticas sanas de donantes, para su cultivo en dichos medios, y posterior manipulación y análisis *in vitro*. El estudio y el protocolo fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Clínico San Carlos, Madrid. Todas las muestras biológicas fueron obtenidas tras la firma del consentimiento informado del paciente, y en el caso de los donantes de órganos, tras la aprobación de sus familiares.

#### 1. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AORTA, PLAQUETAS Y CÉLULAS MONONUCLEARES

Las muestras de pared aórtica aneurismática para la generación del MC-AAA fueron obtenidas durante la reparación quirúrgica de un AAA (mediante cirugía abierta), tomándose la muestra de la región más dilatada de la aorta infrarrenal (siendo esta en todos los casos mayor de 5 cm de diámetro). Además, se obtuvo una muestra de sangre periférica de estos pacientes en tubos de ACD (ácido citrato dextrosa) para la generación de los medios MC-M y MC-P.

Fueron excluidos del estudio los pacientes con collagenopatías, aneurismas inflamatorios, rotos, sintomáticos o con extensión toracoabdominal, así como pacientes con enfermedades inflamatorias sistémicas, antecedentes de enfermedad oncológica o antecedentes quirúrgicos en los 6 meses previos. Los pacientes incluidos suspendieron la medicación antiagregante 10 días previos a la cirugía, y en ningún caso se encontraban bajo tratamiento antitrombótico. Todos los pacientes de los que se obtuvo la muestra de aorta aneurismática habían sido evaluados previamente mediante la realización de una

## MATERIAL Y MÉTODO

TC para descartar la presencia de dilatación a nivel de la aorta torácica y para evaluar las características anatómicas, incluyendo el diámetro máximo.

Las muestras aórticas no aneurismáticas fueron obtenidas a partir de donantes de órganos en parada cardiorrespiratoria. Los injertos se obtuvieron durante el explante renal, que se realiza en bloque incluyendo el riñón y su pedículo, de donde se recogía una muestra aórtica. El diámetro aórtico fue determinado antes mediante un calibrador quirúrgico.

## **2. GENERACIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS Y CULTIVO DE TEJIDO AÓRTICO**

Con el objetivo de inducir cambios característicos de los AAA en tejido aórtico sano, a partir de moléculas generadas por distintos tejidos o células de pacientes con un AAA, se recurrió a los cultivos en medios condicionados, técnica que permite analizar el efecto de sustancias generadas por distintas células sin necesidad de conocer dichas sustancias (ver apartado II.4 CULTIVOS EN MEDIOS CONDICIONADOS).

### **V.2.1 Fundamentos de la técnica**

Como se ha explicado previamente, la técnica se fundamenta en que los distintos tejidos o grupos celulares que condicionan los medios liberan a estos una serie de sustancias con actividad biológica. Posteriormente se expone otro tejido a estas sustancias y se analizan los efectos de dichas sustancias sobre el tejido cultivado (ver figura V.1). Se utiliza un medio control no condicionado para comprobar que los cambios inducidos en el tejido cultivado se deben a las sustancias secretadas por las células que han condicionado el medio, y no por el propio medio.

## MATERIAL Y MÉTODO

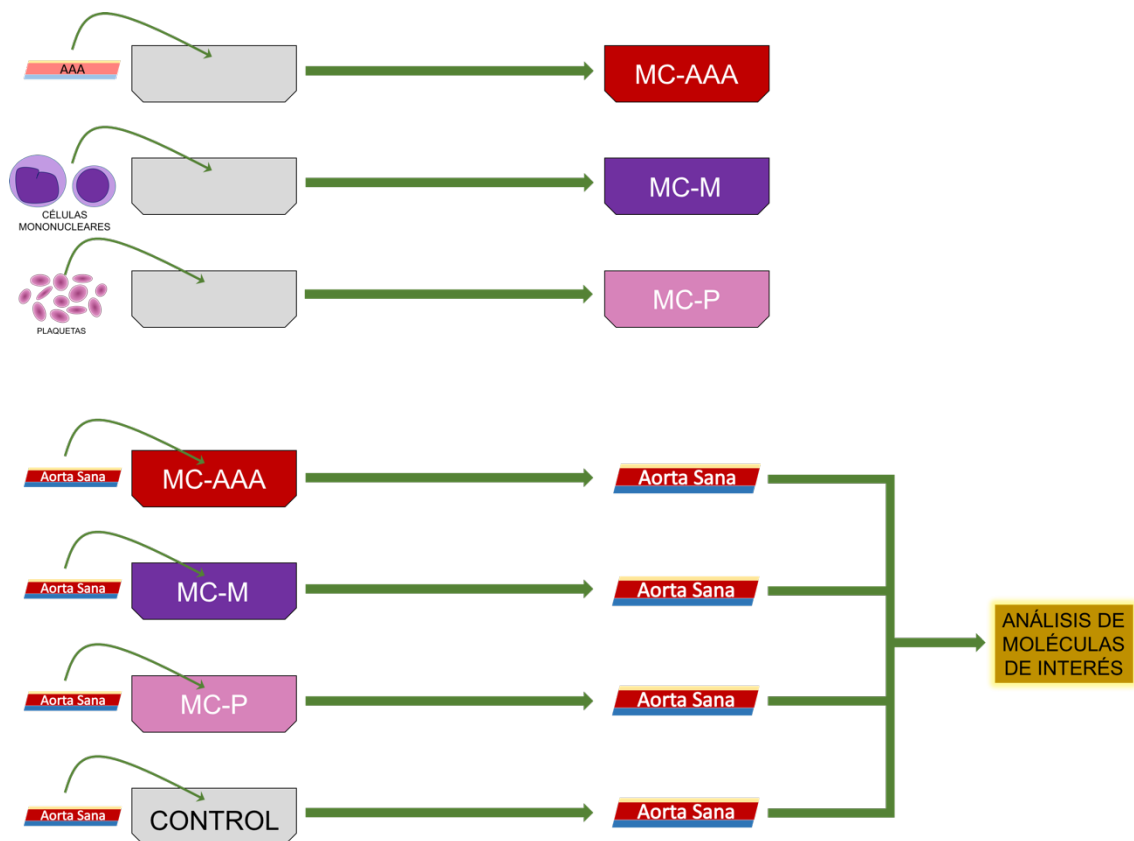


Figura V.1: Esquema de los procesos de generación de medios condicionados y cultivo de tejidos en ellos. AAA: Aneurisma de aorta abdominal, MC-AAA: Medio condicionado por tejido de aneurisma de aorta abdominal, MC-M: Medio condicionado por células mononucleares de paciente portador de AAA, MC-P: Medio condicionado por plaquetas de paciente portador de AAA.

### V.2.2 Preparación de medios condicionados

#### V.2.2.a Material utilizado

- Segmento de aorta aneurismática
- Sangre periférica de pacientes portadores de AAA (5 ml)
- Tubos de ACD
- Gradiente Ficoll
- Medio RPMI con:
  - + Albumina..... 1%
  - + Glutamina..... 5 mmol/L
  - + Estreptomicina.....  $2 \times 10^{-5}$  g/L
  - + Penicilina.....  $2 \times 10^{-5}$  U/L

## MATERIAL Y MÉTODO

### *V.2.2.b Preparación del Medio Condicionado por tejido de AAA (MC-AAA)*

Para la obtención del MC-AAA, se incubó un segmento en fresco procedente de la pared arterial aneurismática en medio RPMI (con 1% albúmina, 5 mmol/L de glutamina,  $2 \times 10^{-5}$  g/L de estreptomicina y  $2 \times 10^{-5}$  U/L de penicilina) durante un periodo de 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa. Transcurridas las 24 horas se recogió el medio condicionado y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C, recuperándose el sobrenadante y desechando el precipitado. El medio se congeló a -80°C para su uso posterior.

### *V.2.2.c Preparación del Medio Condicionado por plaquetas (MC-P)*

Se recogieron 5 ml de sangre periférica de cada paciente con AAA en tubos de ACD. Las muestras fueron procesadas inmediatamente tras su recogida para la obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

El PRP obtenido se incubó a 37°C a una concentración de  $5 \times 10^6$  plaquetas por pocillo durante 1 hora en medio RPMI (con 1% albúmina, 5 mmol/L de glutamina,  $2 \times 10^{-5}$  g/L de estreptomicina y  $2 \times 10^{-5}$  U/L de penicilina). Se utilizó un sistema de membranas semipermeables con poros de 0,40 µm que permite el paso de sustancias, pero no de células. El tamaño utilizado previene la migración de plaquetas hacia la parte inferior, ya que las plaquetas tienen un diámetro medio de 1-3 µm(177). El tiempo de incubación se limitó a una hora en base a observaciones previas en las que evidenció que tiempos superiores favorecían la activación espontánea de las plaquetas(178). Transcurrido ese tiempo, se recogió el MC, y se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y a 2500 rpm, recuperándose el sobrenadante, que fue almacenado a -80°C hasta su uso. El precipitado fue desechado.

## MATERIAL Y MÉTODO

### *V.2.2.d Preparación del Medio Condicionado por células mononucleares (MC-M)*

De los 5 ml de sangre periférica recogidos de cada paciente con AAA en tubos de ACD, se obtuvo también plasma rico en células mononucleares (PRCM), mediante centrifugación en gradiente Ficoll a una proporción 3 (sangre total): 1 (Ficoll) a 1800 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación la fase roja celular y resto células anucleadas habrán migrado al fondo del tubo, mientras que la fase celular mononucleada queda retenida en la parte superficial del Ficoll. Esta nube celular sanguínea mononuclear se recoge y se centrifuga a 2500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente tras lo que se recogen en el pellet las células mononucleadas, desechando el sobrenadante. De igual modo que para la obtención de PRP, las muestras fueron procesadas inmediatamente.

Las células mononucleares obtenidas se incubaron a 37°C durante 1 hora en medio RPMI (con 1% albúmina, 5 mmol/L de glutamina,  $2 \times 10^{-5}$  g/L de estreptomicina y  $2 \times 10^{-5}$  U/L de penicilina). Transcurrido ese tiempo se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y a 2500 rpm, recuperándose el sobrenadante (MC-M), que fue almacenado a -80°C hasta su uso. El precipitado fue desechado.

### **V.2.3 Cultivos en medios condicionados**

#### *V.2.3.a Material utilizado*

MC-AAA

MC-P

MC-M

RPMI

Segmentos de aorta sana



## MATERIAL Y MÉTODO

### *V.2.3.b Preparación de las muestras*

Los segmentos arteriales (de 1 cm<sup>2</sup>) obtenidos de cada una de las muestras de aorta sana procedentes de donante en parada cardiorrespiratoria se incubaron en una estufa de cultivo a 37°C con cada uno de los medios condicionados obtenidos anteriormente durante un periodo de 48 horas. Como medio control se utilizó un medio RPMI en el que no se había cultivado ningún tejido previamente. Una vez transcurrido dicho periodo se retiró el medio de cultivo. A cada uno de los segmentos arteriales se le realizaron dos lavados con suero fisiológico para retirar cualquier resto del medio condicionado, y se guardaron a -80°C para su posterior análisis.

### **3. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT (WB)**

El nivel de expresión de MMP-9, gp91-phox y malato deshidrogenasa (MDH) fue analizado mediante Western Blot (WB).

Esta técnica analítica, también conocida como inmunoblot o electrotransferencia, se utiliza para detectar determinadas proteínas específicas en una muestra concreta (generalmente compleja, como un extracto tisular). Mediante electroforesis en geles en condiciones desnaturalizantes (cargados con dodecilsulfato sódico, SDS) las proteínas del extracto tisular se separan en función del peso molecular (aunque también se pueden separar atendiendo a otros criterios como estructura, hidrofobicidad, etc.). Posteriormente se transfieren a una membrana adsorbente de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PVDF) y se impregna de anticuerpos específicos para la proteína a detectar. Los complejos de unión antígeno anticuerpo son finalmente detectados mediante fluorescencia o por actividad enzimática. Mediante esta técnica se puede evaluar la presencia de una proteína determinada en un extracto y cuantificar su cantidad relativa respecto a otras proteínas de la mezcla, es decir, se trata de una técnica semicuantitativa.

## MATERIAL Y MÉTODO

### V.3.1 Material utilizado

Muestras de aorta cultivada en MC y medio control.

Tampón de homogenización

*Kit Pierce® BCA Protein Assay*

Tampón de desnaturalización de *Laemmli*

Marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich, St Louis, MI, USA*)

Geles de electroforesis (SDS-PAGE 15%)

Tampón electroforesis (Tris 25mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%)

Tampón de transferencia

Membrana de nitrocelulosa (*Inmobilon-P®*; Millipore, USA)

Papel de filtro

Rojo *Ponceau*

Azul de *Coomasie*

Solución de destinción (metanol 25% + ácido acético 5%)

Tampón de bloqueo (albúmina en PBS-Tween 0,5%)

Anticuerpos:

#### **MMP-9**

Primario: Anti-MMP-9 (Santa Cruz. Sc-6840. Policlonal) dil 1/1000.

Secundario: Anti-goat (Santa Cruz. Sc-2020) dil 1/2500.

#### **Gp91 phox**

Primario: Anti gp91 phox (Santa Cruz. Sc-5827. Policlonal) dil 1/1000.

Secundario: Anti-goat (Santa Cruz. Sc-2020) dil 1/2500.

#### **MDH**

Primario: Anti MDH (Santa Cruz. Sc-13377. Policlonal) dil 1/500.

Secundario: Anti-rabbit (Santa Cruz. Sc-2030) dil 1/500.

## MATERIAL Y MÉTODO

### **$\beta$ -Actina**

Primario: Anti  $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich. A5441. Monoclonal) dil 1/1500.

Secundario: Anti-mouse (Santa Cruz. Sc-2031) dil 1/2500.

Peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*).

Kit ECL (*GE Healthcare*, Little Chalfont Buckinghamshire, UK)

### **V.3.2 Preparación de las muestras**

#### *V.3.2.a Homogenización de las muestras*

Las muestras de aorta fueron homogeneizadas con el homogeneizador *Ultra-Turrax*<sup>®</sup> T8 (IKA<sup>®</sup>-Werke). Dicho homogeneizador es una unidad de dispersión para conseguir emulsiones y dispersiones con un alto rendimiento. Es un instrumento de mano de alta calidad, con una potencia de hasta 100 W y unas velocidades de 5000 a 25000 rpm. Gracias al amplio rango de velocidades y a que el elemento dispersor tiene un diámetro de 5-8 mm, incluso pequeñas cantidades se procesan y dispersan rápidamente.

Las muestras de aorta fueron homogenizadas en un tampón que contenía Tris/HCl 25 mM con un pH de 7,8, sacarosa 0,25 M y EDTA 1mM. Posteriormente los tejidos homogeneizados se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se congeló a -80°C hasta su análisis.

#### *V.3.2.b Medida de proteínas. Método BCA*

Para poder comparar la expresión de una proteína entre distintas muestras, es fundamental que la cantidad total de proteína que se estudia de cada muestra sea la misma, por lo que es necesario conocer la concentración de proteínas de cada muestra.

Para estimar las concentraciones de proteínas en las muestras se utilizó el *kit Pierce*<sup>®</sup> *BCA Protein Assay*. Se trata de una formulación basada en el ácido bicinonínico (BCA), compatible con detergentes, para la detección colorimétrica y cuantificación de

## MATERIAL Y MÉTODO

proteínas totales. El BCA forma un complejo azul púrpura con el  $\text{Cu}^+$ , de modo que permite monitorizar la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  por las proteínas a un máximo de absorbancia de 562 nm de  $\lambda$  y de este modo cuantificar las proteínas. La estructura macromolecular de la proteína, el número de uniones peptídicas y la presencia de cuatro aminoácidos en particular (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) han sido descritos como los responsables de la formación de color con BCA. La concentración de proteínas se determina en referencia a una proteína estándar común, en este caso la albúmina bovina.

El ensayo BCA es más sensible y aplicable que los métodos de *Biuret* o de *Lowry*. Además, tiene menos variabilidad que el método de *Bradford*.

### V.3.2.c Desnaturalización de las proteínas

Las muestras homogeneizadas fueron solubilizadas en el tampón *Laemmli*. Este tampón, con un pH de 6,8 aproximadamente, está especialmente formulado para la preparación de muestras en geles de poliacrilamida, y su formulación es la siguiente:

- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)..... 4%
- Glicerol..... 20%
- 2-mercaptoetanol ..... 10%
- Azul de bromofenol ..... 0.004%
- M Tris-HCl..... 125 mM

El SDS confiere a todas las proteínas la misma carga negativa de tal forma que ésta no influirá en la migración de las mismas, y por lo tanto la separación solo se realizará en función del peso molecular. Además, desnaturaliza las proteínas para que la estructura tridimensional tampoco tenga efecto en la migración.

El glicerol confiere densidad a la muestra para que las proteínas caigan al fondo de los pocillos y no se pierdan.

## MATERIAL Y MÉTODO

El 2-mercaptoetanol rompe los enlaces disulfuro entre proteínas y dentro de la misma proteína para una adecuada separación de las mismas sin influencia de su estructura terciaria.

El azul de bromofenol tiñe el frente de las proteínas (la zona que más se ha avanzado en el gel) para poder orientarnos sobre la localización de las proteínas en el gel y saber el momento en el que hay que detener la electroforesis.

El M Tris-HCl es un componente habitual de los tampones con una constante de disociación ( $pK_a$ ) de 8,01 a 25°C, lo que le confiere una gran capacidad para mantener un determinado rango de pH simulando las condiciones fisiológicas del ser humano.

Tras su disolución en la solución de Laemmli, las muestras fueron desnaturalizadas nuevamente mediante calor, calentándolas a 95°C durante 5 minutos y posteriormente enfriadas en hielo durante 2 minutos.

### V.3.3 Electroforesis en gel

Se procedió a la separación de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% (w/v). En cada pocillo se cargó la misma cantidad de proteína (20  $\mu$ g), calculado mediante el método BCA descrito previamente. En el primer pocillo se cargaron marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich*) para monitorizar el avance de las proteínas y referenciar el peso molecular en función de la posición en el gel.

De forma paralela se cargaron que servirían para la determinación del nivel de expresión de la proteína  $\beta$ -actina, utilizada como control de carga proteica.

### V.3.4 Transferencia y bloqueo de proteínas

Una vez hubo finalizado la electroforesis, las proteínas separadas en los distintos geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Inmobilon-P®*) mediante electrotransferencia semihúmeda. Para ello, se deposita el gel sobre la

88

## MATERIAL Y MÉTODO

membrana, y éstos entre papel de filtro, en el Trans-blot semiseco, donde se añade el tampón de transferencia, cuya composición es la siguiente:

- Tris.....25 mM
- Glicina.....250 mM
- Metanol 15% ..... 75 mL
- H<sub>2</sub>O.....hasta completar 500 mL

Se aplicó una corriente de 400 mA perpendicular al gel durante 40-45 minutos, en función del peso molecular de la proteína a estudio, de tal forma que las proteínas migraron del gel a la membrana.

La transferencia a una membrana hace que el manejo sea más fácil, dado que la tinción y el lavado son más rápidos, las proteínas se concentran en la superficie y permite la incubación con anticuerpos.

Posteriormente se comprueba que la transferencia se ha realizado correctamente mediante la tinción de las proteínas en la membrana (con rojo *Ponceau*) y/o en el gel (con azul de *Coomassie*). De forma ideal, se deberían ver bandas intensas en la membrana, y de muy baja intensidad en el gel, especialmente en la zona correspondiente al peso molecular de la proteína de interés. Se destiñe el gel mediante solución de destinción y la membrana mediante lavados repetidos con agua destilada.

Dado que las proteínas se unen a la membrana de forma inespecífica, es necesario bloquear los segmentos de membrana donde no hay proteínas, para evitar que los anticuerpos con los que marcaremos la proteína de interés se unan de forma inespecífica a estas regiones. Este proceso se denomina bloqueo y se realiza mediante la unión de albumina, disuelta al 5% en PBS-Tween (tampón de bloqueo). Se incluyeron las membranas en el tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

## MATERIAL Y MÉTODO

### V.3.5 Marcaje de las proteínas

Transcurrido el tiempo de bloqueo, las membranas fueron incubadas con anticuerpos monoclonales primarios específicos para MMP-9, gp91 phox, MDH y  $\beta$ -actina, que se utilizó como control de carga. El tiempo de incubación fue de 12 horas a 4°C. Tras la incubación, se procedió a lavar las membranas con PBS-Tween 0,5% durante 5 minutos (3 lavados), para eliminar los anticuerpos no unidos de forma específica.

Posteriormente se incubaron con anticuerpos monoclonales secundarios específicos para los anticuerpos primarios empleados, mencionados previamente y que se encontraban conjugados con peroxidasa de rábano.

### V.3.6 Análisis

La existencia de señal de expresión proteica se reveló mediante el empleo de reactivos potenciadores de luminiscencia mediante el kit ECL (*GE Healthcare*, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). En este caso la reacción catalizada por la peroxidasa de rábano es la transformación del sustrato Lumigen PS-3 en un éster de acridinio. Éste reacciona con el peróxido en condiciones alcalinas emitiendo una luz con una  $\lambda$  de 428 nm, cuya intensidad es máxima entre 15 y 20 minutos tras el inicio de la reacción.

Esta luz fue detectada mediante un equipo transiluminador (*Gel Logic 440 Imaging System*, Kodak, USA). Tras el revelado y la detección, la expresión de las proteínas fue cuantificada a través de un análisis por densitometría (*Quantity One Software*, Bio-Rad). Para determinar el peso molecular de las proteínas en estudio se utilizaron proteínas marcadas.

## 4. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En el caso de la LDH y de la MMP-9 se estudió su actividad enzimática. La actividad enzimática es la cantidad de sustrato convertido por unidad de tiempo. Ésta,

## MATERIAL Y MÉTODO

mide la cantidad de enzima activa presente y el nivel de actividad de ésta, a menudo dependiente de las condiciones en las que tiene lugar la reacción (temperatura, pH, presencia de coenzimas, ...).

Para ello se utilizaron kits comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante:

*Lactate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit* (K726-500, *BioVision Research Products*). La LDH reduce NAD a NADH, que posteriormente interacciona con una sonda específica produciendo una emisión con una  $\lambda$  de 450 nm. Se mide dicha emisión en dos tiempos distintos, lo que permite la realización de una recta cuya pendiente representa la actividad. No es necesaria la purificación de la muestra y permite detectar actividades de 1-100 U/ml de LDH.

*Human MMP-9 Activity Assay Kit* (QZBMMP9H, *QuickZyme Biosciences*). Requiere activación de proMMP-9 mediante AMPA y posteriormente se añade un proenzima que es activado por MMP-9 y un sustrato específico que reacciona con dicho enzima activado, produciendo un producto con una emisión con una  $\lambda$  de 405 nm. De igual modo que en el kit previo, se mide la emisión en dos tiempos distintos, lo que permite la realización de una recta cuya pendiente representa la actividad. Permite detectar actividades de 0,1 ng/ml a 5 pg/ml.

### 5. ANÁLISIS POR ELISA

Los niveles de los marcadores inflamatorios IL-6, IL-1 $\beta$  y CD40L, se determinaron a través de la realización de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas).

Ésta es una técnica analítica que permite la detección de determinadas sustancias (generalmente antígenos) en una muestra en fase líquida.



## V.5.1 Fundamentos de la técnica

Los antígenos de la muestra se fijan a la superficie de los pocillos de forma directa (mediante unión de distintos antígenos a la superficie), o a través de anticuerpos específicos para el antígeno a estudiar, que previamente han sido adheridos a la superficie de los pocillos (esta última técnica se conoce como *sándwich*). Posteriormente se añaden anticuerpos específicos para el antígeno a estudiar, y estos se adhieren firmemente a él. El anticuerpo se encuentra conjugado a un enzima que cataliza una reacción que produce un efecto ponderable (mediante espectrofotometría habitualmente) (ver figura V.2). En ocasiones, el anticuerpo específico para el antígeno no está conjugado con el enzima (anticuerpo primario), y es necesario añadir un segundo anticuerpo conjugado con el enzima (anticuerpo secundario) que se une al primero, en lo que se conoce como ELISA indirecto (de esta forma la detección tiene una mayor sensibilidad, dado que existe una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios al anticuerpo primario).

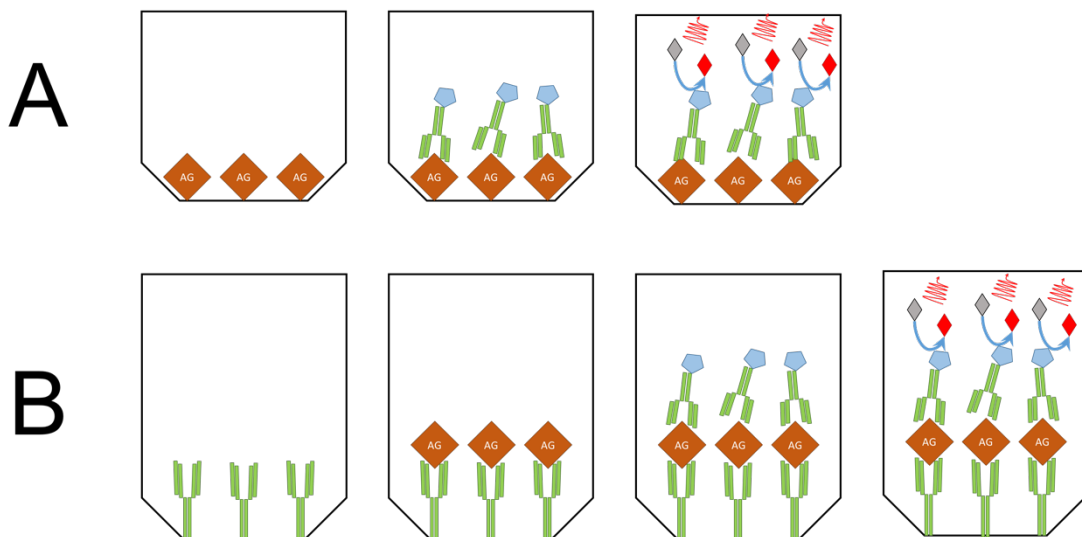


Figura V.2: Esquema de los pasos básicos para realización de un ELISA. A: ELISA directo, con el antígeno fijado a los pocillos. B: ELISA en *sándwich* con un anticuerpo específico para el antígeno a estudio fijado a los pocillos. En ambos casos se trata de un ELISA directo porque no hay un anticuerpo secundario conjugado al enzima. AG: Antígeno. En azul se representa en enzima ligado al anticuerpo (verde) que cataliza la reacción que genera una señal detectable (rojo) mediante espectrofotometría.

## MATERIAL Y MÉTODO

### V.5.2 Material utilizado

Muestras de aorta cultivada en MC y medio control homogeneizadas.

*Kits ELISA (R and D Systems)*

- *Human IL-6 Immunoassay*, D6050. *R and D Systems* (sensibilidad 0.70 pg/ml; error intraensayo 1.7-4.4%; error interensayo 2.0-3.7 %).

- *Human IL-1 $\beta$ /IL-1F2 Immunoassay*, DLB50. *R and D Systems* (sensibilidad 1.0 pg/ml; error intraensayo 2.3-2.4%; error interensayo 4.1-7.1 %).

- *Human CD40 Ligand/TNFSF5 Immunoassay*, DCDL40. *R and D Systems* (sensibilidad 2.1-10.1 pg/ml; error intraensayo 5.1-5.4%; error interensayo 6.2-6.4 %).

### V.5.3 Preparación de las muestras y análisis

Tras la homogenización de las muestras (ver apartado V.3.2.a Homogenización de las muestras), se procedió a la determinación de cada uno de los marcadores inflamatorios con *kits* ELISA específicos para dichos marcadores, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En todos los casos se trata de un ELISA directo (el anticuerpo específico del antígeno a estudiar lleva en enzima conjugado) en *sándwich* (en antígeno no se fija directamente al pocillo, sino a un anticuerpo específico que ya está fijado al pocillo). La reacción es catalizada de nuevo por la peroxidasa de rábano, que transforma el sustrato que aporta el kit (tetrametilbenzidina, de color amarillo) en tetrametilbenzidina dimina, tiñendo el pocillo de un color característicamente azul. La cantidad de sustrato que se transforma es proporcional a la concentración de antígeno. Cuando no se transforma más sustrato el pocillo vuelve a teñirse de amarillo, pero se puede detectar la cantidad de sustrato transformado mediante espectrofotometría a 450 nm de  $\lambda$  (detecta la luz azul emitida por el sustrato transformado).

### 6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PIRUVATO Y LACTATO

#### V.6.1 Piruvato

El contenido de piruvato presente en el tejido aórtico sano cultivado se cuantificó utilizando el *Pyruvate Assay Kit* (K609-100; *BioVision Research Products*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El piruvato es oxidado por la piruvato oxidasa mediante reacciones enzimáticas colorimétricas ( $\lambda=570$  nm) y de fluorescencia (Ex/Em=535/587 nm), siendo el color/fluorescencia proporcional al contenido de piruvato de la muestra.

#### V.6.2 Lactato

El contenido de lactato presente en el tejido aórtico sano cultivado se cuantificó utilizando el *Lactate Assay Kit* (K609-100; *BioVision Research Products*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El lactato reacciona con una mezcla enzimática proporcionada en el kit generando un producto que al interaccionar con una sonda específica produce emisión con una  $\lambda$  de 570 nm y fluorescencia (Ex/Em=535/587 nm). No es preciso el pretratamiento o purificación de la muestra, pudiendo detectar concentraciones entre 0,001-10 mM.

### 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS (versión 22.0). Las variables cuantitativas se expresaron como la media  $\pm$  EEM (error estándar de la media). Las concentraciones de distintas moléculas se expresaron en: unidades arbitrarias cuando se utilizó WB y en medidas del sistema internacional cuando se utilizó ELISA o los kits comerciales de piruvato o lactato (pg/mL/g tejido o mmol/L/80  $\mu$ g proteína). Se emplearon test no paramétricos para analizar diferencias entre las variables cuantitativas (U Mann Whitney).





## VI. RESULTADOS



## VI RESULTADOS

### 1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Se obtuvieron muestras de 6 pacientes con AAA por lo que se crearon 6 MC-AAA, 6 MC-P y 6 MC-M, así como un MC. Asimismo, se obtuvieron 6 muestras de aorta sana de pacientes donantes en parada cardiorrespiratoria, que se cultivaron en los distintos medios.

Las características demográficas, factores de riesgo cardiovascular y diámetro aórtico de los pacientes con AAA y de los donantes en parada cardiorrespiratoria se describen en la tabla VI.1.

	Pacientes con AAA n = 6	Donantes n = 6
Edad (años), <i>media ± EEM</i>	73,0 ± 2,57	51,17 ± 4,33
Sexo (hombres/mujeres)	6/0	5/1
Diámetro máximo del AAA (mm), <i>media ± EEM</i>	60,5 ± 3,54	< 20
Trombo intraluminal	6/6	-
Factores de riesgo cardiovascular		
Tabaquismo	3/6	3/6
Hipertensión arterial	4/6	2/6
Dislipemia	3/6	2/6
Diabetes Mellitus	1/6	0/6

Tabla VI.1. Características demográficas, factores de riesgo cardiovascular y características de la aorta de los pacientes incluidos en el estudio.



## RESULTADOS

### 2. ANÁLISIS DE MOLÉCULAS INFLAMATORIAS

La cuantificación de las principales moléculas inflamatorias en los tejidos aórticos cultivados en los distintos medios se realizó mediante ELISA. Como se observa en la figura VI.1, no existió modificación en la producción de IL-1 $\beta$  por parte del MC-P, pero sí una tendencia a aumentar la producción de IL-6, lo que sugeriría la existencia de una inducción de respuesta inflamatoria plaquetaria. En cambio, los MC-M y MC-AAA tendieron a estimular la producción tanto de IL-6 como de IL-1 $\beta$ .

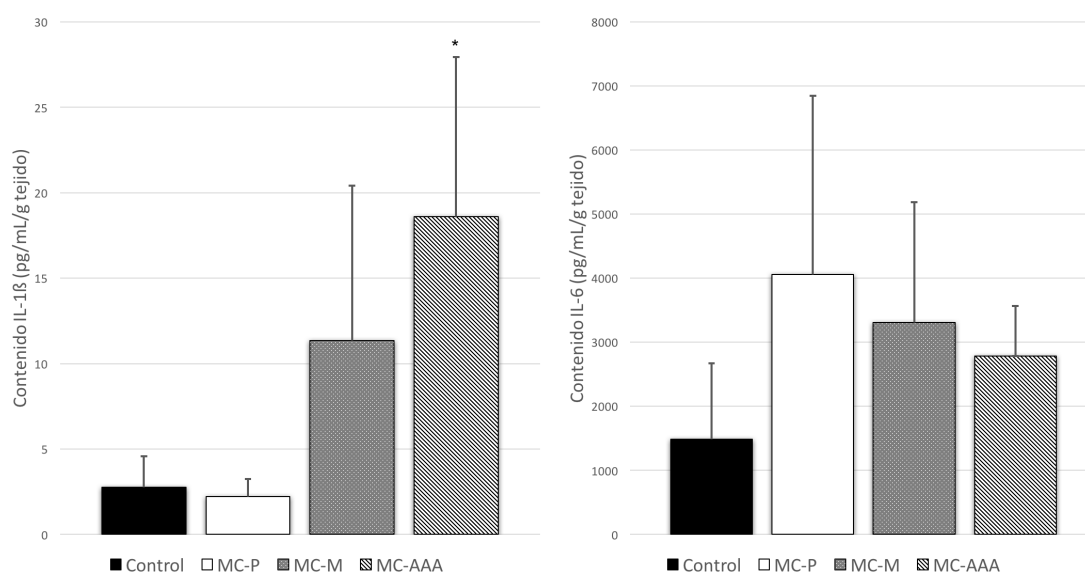


Figura VI.1. Contenido de IL-1 $\beta$  e IL-6 en los tejidos expuestos a distintos medios. \*: p<0,005 respecto al medio control.

A pesar de que únicamente resultó significativa la diferencia entre las concentraciones de IL-1 $\beta$  del MC-AAA, se observa una tendencia a la producción de IL, especialmente la IL-1 $\beta$  tras exposición a AAA y la IL-6 tras exposición a plaquetas. El MC-M indujo un aumento moderado en la concentración de ambas IL.

## RESULTADOS

En cuanto al CD40L (ver figura VI.2), marcador inflamatorio y de riesgo cardiovascular, su expresión fue máxima en los tejidos cultivados en MC-P, con diferencias significativas respecto al grupo control. Los tejidos cultivados en MC-AAA o MC-M, no presentaron incremento de este mediador inflamatorio respecto a los tejidos de control.

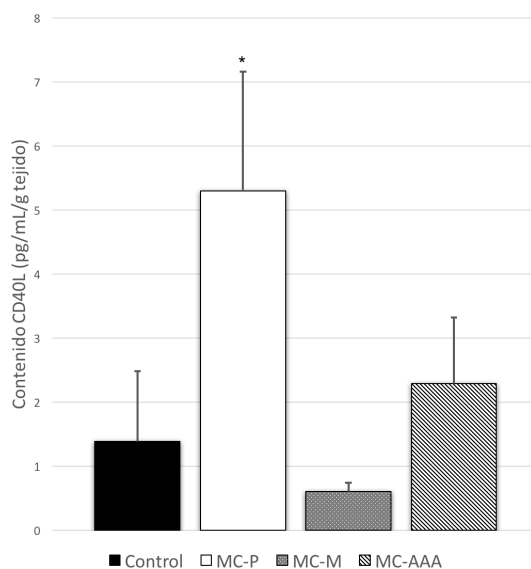


Figura VI.2. Contenido de CD40L en los tejidos expuestos a distintos medios. \*:  $p < 0,005$  respecto al medio control.

La subunidad *gp91phox*, marcador de estrés oxidativo en los tejidos, se encontraba especialmente aumentada en el MC-P, aunque aumentó en todos los medios condicionados respecto al grupo control. Las diferencias que se observaron entre los tres medios y el medio control no alcanzaron la significación estadística, aunque como se observa en la figura VI.3, sí que existe una tendencia a una mayor expresión en los tejidos expuestos a medios condicionados, reflejando un mayor estrés oxidativo en estos tejidos. La imagen revelada del WB se muestra en la figura VI.4.

## RESULTADOS

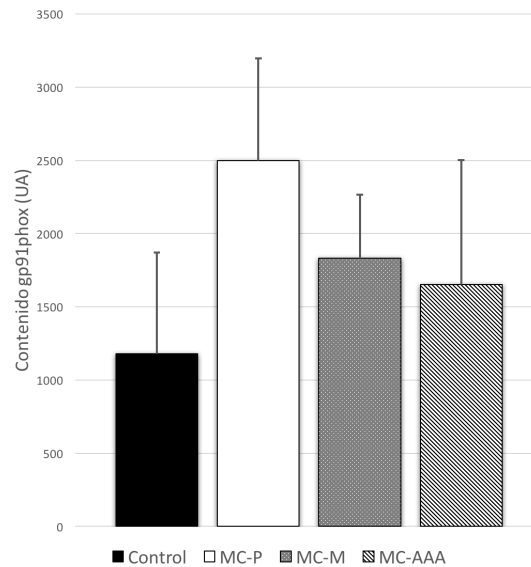


Figura VI.3. Contenido de gp91phox en los tejidos expuestos a distintos medios.

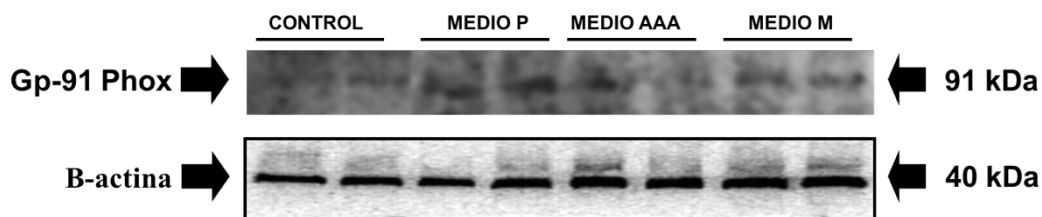


Figura VI.4. Western Blot de gp-91phox.

### 3. ANÁLISIS DE MMP-9

En la figura VI.5 se pueden observar la actividad y concentración de MMP-9 obtenidas en los homogenizados de aorta sana cultivados en los distintos medios. La imagen revelada del WB se muestra en la figura VI.6.

Como se puede observar la actividad de MMP-9 no es distinta entre la arteria cultivada en el medio control y aquellas cultivadas en los MC-P y MC-AAA. Sin embargo, sí que existió un aumento de la actividad cuando se expuso la aorta sana al MC-M.

Paradójicamente, la expresión de MMP-9 en la aorta expuesta a cualquier MC fue menor que en el grupo control. Dada la ausencia de diferencias en cuanto a la actividad enzimática junto con la existencia de diferencias tan importantes en la concentración, se

## RESULTADOS

puede deducir que la MMP-9 existente en los medios condicionados es una enzima mucho más activa que la existente en el medio control. Esta consideración se desarrollará en mayor profundidad en el apartado VII. DISCUSIÓN.

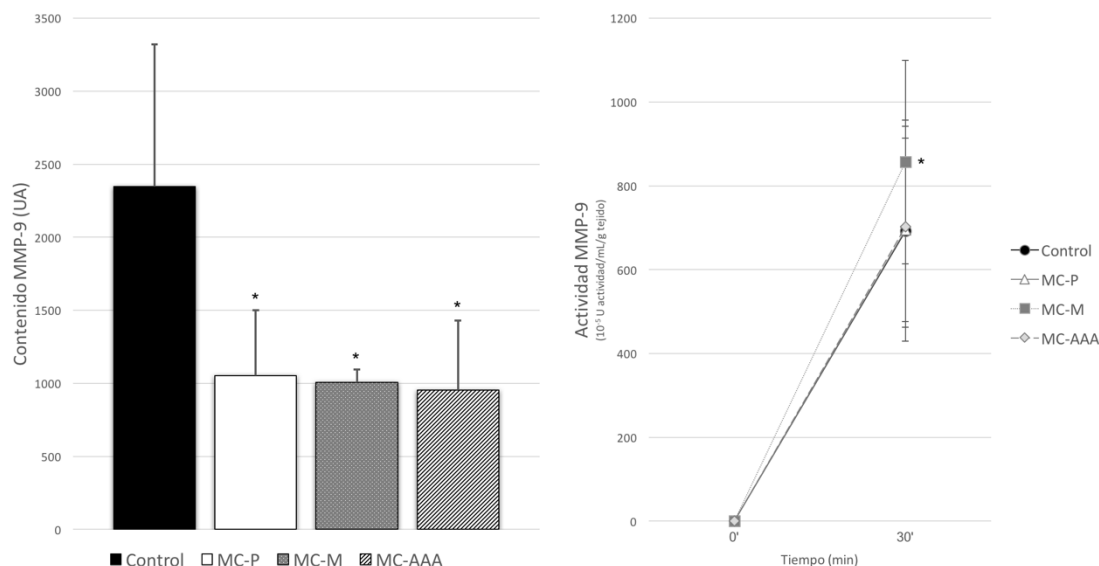


Figura VI.5. Contenido y actividad de MMP-9 en los tejidos expuestos a distintos medios. \*:  $p < 0,005$  respecto al medio control.

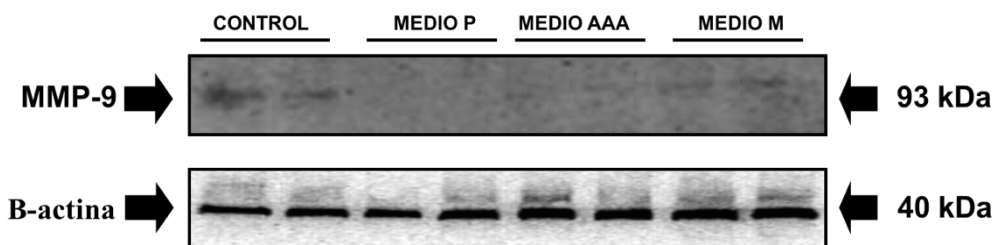


Figura VI.6. Western Blot de MMP-9.

### 4. ANÁLISIS DE METABOLISMO ENERGÉTICO

#### VI.4.1 Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH)

Como se observa en la figura VI.7, los niveles de actividad de LDH fueron superiores en el grupo control que en los tejidos cultivados en medios condicionados. Se observó una disminución de la actividad de LDH en los MC. Cabe recordar que la LDH es la enzima que activa la ruta metabólica anaerobia para la utilización del piruvato, típica

## RESULTADOS

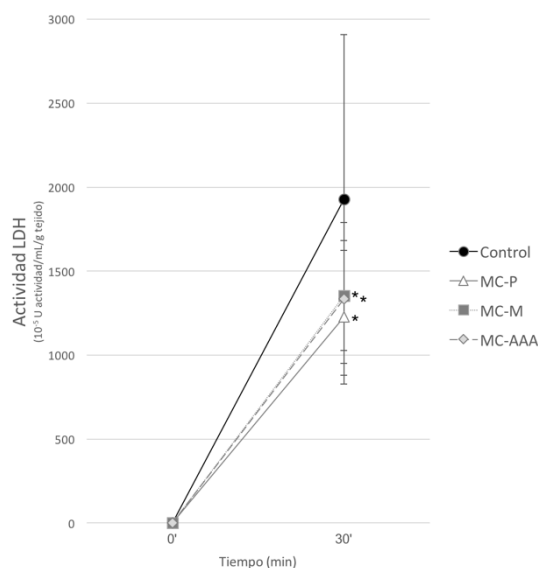


Figura VI.7. Actividad de LDH en los tejidos expuestos a distintos medios. \*:  $p < 0,005$  respecto al medio control.

de la aorta enferma, y por tanto los resultados podrían parecer paradójicos. No obstante, como se comentará más adelante y se profundizará en la discusión, existen otros metabolitos y enzimas que reflejan que en ciertos medios puede existir un incremento del metabolismo anaeróbico sin un aumento en la actividad de LDH.

### VI.4.2 Expresión de malato deshidrogenasa (MDH)

La expresión de MDH (figura VI.8) también fue superior en el grupo control que en las aortas expuestas a los diferentes medios condicionados, de forma muy significativa. Dentro de los MC, la expresión fue mínima en los tejidos expuestos al MC-AAA, reflejando una disminución de la concentración de una enzima clave en el Ciclo de Krebs, que recordemos que se lleva a cabo únicamente en condiciones aerobias, tras exponer el tejido aórtico a los medios condicionados. La figura VI.9 muestra el revelado del WB.

## RESULTADOS

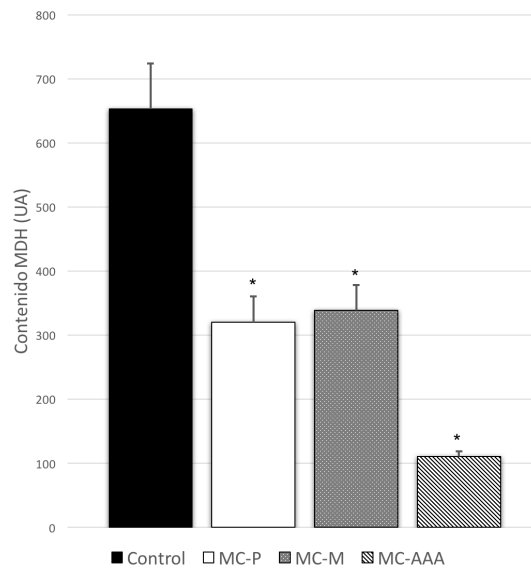


Figura VI.8. Expresión de MDH en los tejidos expuestos a distintos medios. \*:  $p < 0,005$  respecto al medio control.

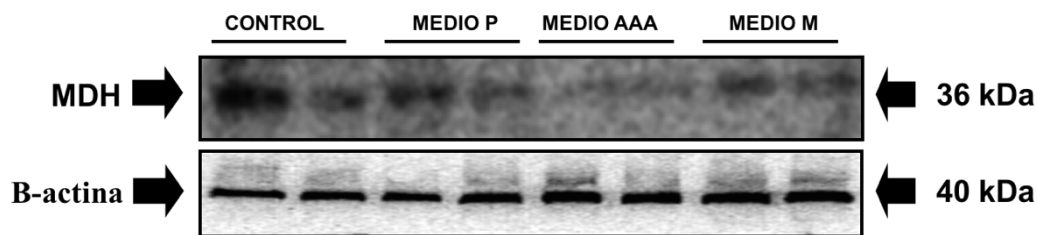


Figura VI.9. Western Blot de MDH.

### VI.4.3 Contenido de piruvato y lactato

Tal y como refleja la figura VI.10, se observa que no existieron cambios significativos en el contenido de lactato entre el tejido aórtico control y los cultivados en los MC-P y MC-M. Sin embargo, se observa una clara tendencia, aunque no significativa, a un mayor contenido de lactato en el tejido aórtico cultivado en el MC-AAA. Respecto al piruvato, no se observaron diferencias significativas en el contenido del mismo en los tejidos aórticos cultivados en los distintos MC.

## RESULTADOS

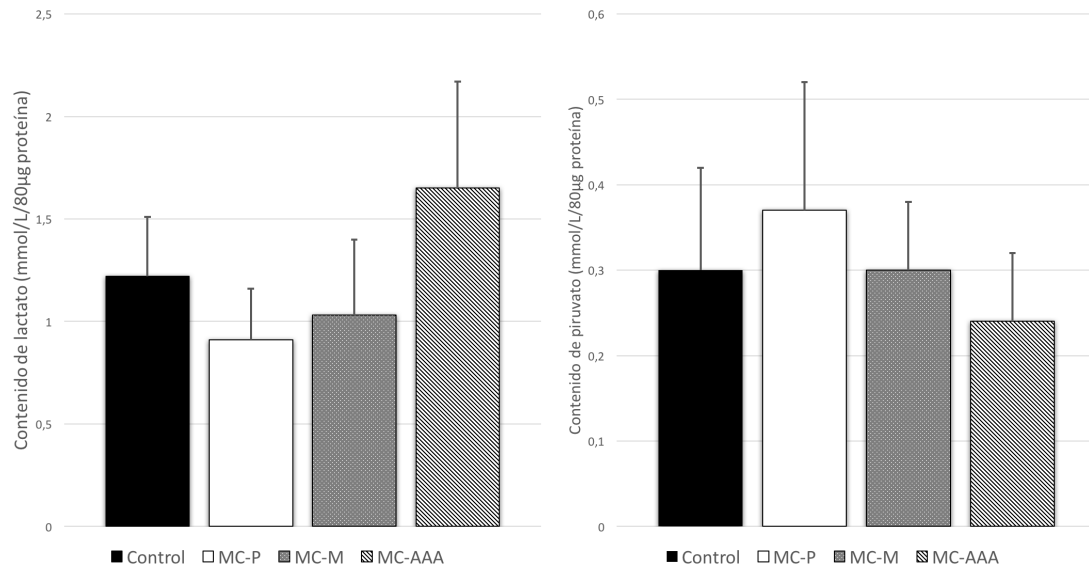


Figura VI.10. Contenido de piruvato y lactato en los tejidos expuestos a distintos medios.







## VII. DISCUSIÓN



### VII DISCUSIÓN

La presente tesis ha puesto de manifiesto la capacidad que tienen moléculas que se encuentran en la aorta aneurismática, las plaquetas y las células mononucleares para inducir cambios inflamatorios característicos de los AAA en tejido aórtico sano. También ha puesto de manifiesto la capacidad de los medios condicionados por aorta aneurismática para inducir cambios metabólicos en la aorta sana, siendo ésta exclusiva de este medio, ya que los medios condicionados por plaquetas o células mononucleares no han inducido cambios en el metabolismo del tejido aórtico sano.

A lo largo de las últimas décadas, el estudio de la fisiopatología de los AAA ha evolucionado desde la teoría aterosclerótica hacia una teoría en la que fenómenos inflamatorios e inmunológicos juegan un papel central. Éstos fenómenos, interrelacionados entre sí de forma compleja, se deben sobre todo a un aumento de la destrucción de la MEC, de la apoptosis de CML y de estrés oxidativo. Para que tengan lugar, es necesaria la participación de numerosos grupos celulares que componen un infiltrado inflamatorio localizado fundamentalmente, aunque no de forma exclusiva, en la adventicia vascular.

A pesar de los avances realizados en el estudio de la fisiopatología de los AAA, es necesaria una mayor comprensión de estos fenómenos inflamatorios y de los grupos celulares que participan en ellos ya que la causa por la que se inician estos mecanismos es todavía desconocida. Además, un mayor conocimiento podría proporcionar dianas terapéuticas para esta patología, que en la actualidad sólo puede ser resuelta mediante cirugía, con los riesgos que ésta conlleva.

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto la relación que tiene el metabolismo aerobio en la pared de las arterias en el desarrollo de la función vascular normal(31). De modo contrapuesto, cuando el metabolismo en la pared arterial es

## DISCUSIÓN

anaerobio, existe una disfunción vascular, que ha sido descrita tanto en fenómenos relacionados con aterosclerosis como con patología aneurismática.

Tras los resultados obtenidos, no podemos atribuir de forma exclusiva la reacción inflamatoria a ninguno de los dos grupos celulares estudiados (plaquetas y células mononucleares) ni al tejido aórtico aneurismático, dado que todos los MC han inducido cierto efecto inflamatorio sobre aorta sana. Es decir, las 3 muestras han sintetizado factores que producen inflamación en tejido aórtico sano.

No obstante, se ha observado que la capacidad inflamatoria de las plaquetas es selectiva, puesto que el MC-P no ha provocado un aumento de IL-1 $\beta$  pero sí de IL-6. Cabe recordar que la IL-1 $\beta$  se asocia a la fase aguda de la inflamación, y la IL-6 a la fase crónica. La relación de las plaquetas con los AAA se da fundamentalmente en el TIL que se forma tras la dilatación inicial de la aorta, por el flujo turbulento que se forma al aumentar el diámetro luminal. Parece lógico, por tanto, que las plaquetas estén participando en etapas más avanzadas de la enfermedad y no en los fenómenos inflamatorios iniciales, y pueden tener importancia en el mantenimiento de un ambiente proinflamatorio tras una fase de dilatación inicial.

El hecho de que el MC-P haya inducido un aumento significativo de CD40L en el tejido aórtico sano y no los MC-AAA ni MC-M, refuerza la idea de una capacidad inflamatoria específica de las plaquetas. Existe evidencia en que la interacción entre CD40 y CD40L en plaquetas puede estar involucrada en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y se ha observado una correlación entre los niveles de CD40L en plaquetas y linfocitos con la aparición de síndrome coronario agudo(179). En el caso concreto de los AAA se ha observado que, junto con otros productos secretados por las plaquetas, como la P-selectina soluble y la glicoproteína V soluble, el CD40 L se encuentra aumentado en el plasma de pacientes con AAA, siendo la principal fuente de producción

## DISCUSIÓN

de estas sustancias las plaquetas secuestradas en el TIL de los AAA(180). Esta molécula, estimula la producción de MMP-9 por parte de los macrófagos(159) y supone un puente de unión entre trombosis e inflamación.

El gp91phox se relaciona con la producción de ion superóxido y constituye un marcador de estrés oxidativo en tejidos. En estudios previos, se ha observado un aumento de esta subunidad de la NADPH oxidasa en tejido de AAA(86) y además se relaciona con mayores tasas de crecimiento del AAA. Existen muchas vías para inducir un aumento del estrés oxidativo: Factores mecánicos(84) (estrés parietal), inmunológicos (mediados por macrófagos a través de citoquinas proinflamatorias(60)), factores de crecimiento (angiotensina II y PDGF(85)), mediadores lipídicos (leucotrienos y ácido lisofosfatídico y LDL), así como las propias ERO incrementan la actividad de la NADPH oxidasa presente en las células del tejido vascular(81).

Esta variedad de vías por las que se puede incrementar el estrés oxidativo en el tejido vascular podría explicar que hayamos observado un incremento de gp91phox al cultivar aorta sana en los tres tipos de MC. Aunque este incremento no ha resultado significativo, probablemente se relacione con el pequeño tamaño muestral.

Como se ha descrito previamente, la destrucción de la MEC por parte de las MMP constituye uno de los pilares fundamentales de la fisiopatología de los AAA. La MMP-9 es la MMP más característica de los AAA. En nuestro estudio, los resultados obtenidos con la MMP-9 pueden parecer paradójicos, ya que únicamente existen diferencias en la actividad encontrada en las arterias cultivadas en el MC-M, y, por otro lado, la expresión ha resultado más baja en todos los MC respecto al grupo control. No obstante, el hecho de que exista una actividad enzimática igual (en el caso de los MC-AAA y MC-P) con una menor concentración de enzima, implica que los enzimas que se encuentran en los tejidos cultivados en MC tienen una actividad mayor que las del medio control (mayor

## DISCUSIÓN

actividad enzimática por molécula). Este resultado es más exacerbado en los tejidos expuestos a MC-M, dado que la actividad es mayor pese a una menor cantidad de enzima presente en tejido.

Los resultados obtenidos en relación con inducción de cambios inflamatorios difieren de aquellos obtenidos en relación con la inducción de cambios metabólicos, en el sentido de que en el segundo caso sí que podemos atribuir la exposición al MC-AAA como la causante de la inducción de estos cambios. Se ha demostrado que existe un viraje hacia el metabolismo anaerobio en la pared de la aorta aneurismática(181). Este cambio en las rutas metabólicas del tejido vascular se caracteriza por un aumento de lactato, sin un aumento en la actividad de la LDH, consistente con los cambios inducidos en nuestro experimento.

Existe controversia en cuanto a qué explicaría este cambio hacia el metabolismo anaerobio. Por un lado, cabe recordar que la aorta se nutre mediante los *vasa vasorum* en sus capas más externas (adventicia y parte más externa de la media) y mediante difusión en las capas más internas (íntima y parte más interna de la media). Además, en la aorta sana el flujo es laminar, pero la dilatación de la luz arterial presente en los AAA modifica los parámetros reológicos, dada la existencia de un flujo lento y turbulento que conduce a la formación de un TIL. Este trombo tiende a dejar una luz similar a la de la aorta sana, y además de no proteger la pared arterial del estrés parietal circunferencial(39), contribuye a generar un estado hipóxico en la pared vascular por disminuir la difusión de oxígeno hacia ésta(31). Este estado hipóxico podría ser la causa de la activación del metabolismo anaerobio en la pared de los AAA. Además, autores como Elzschig y Carmeliet(182) describieron la compleja relación existente entre la inflamación y el metabolismo del oxígeno: El hecho de que la hipoxia puede suponer un estímulo para fenómenos inflamatorios tanto sistémicos(183), como a nivel celular(184) podría llevar a

## DISCUSIÓN

pensar que la hipoxia producida por el TIL en la pared aneurismática puede también contribuir al desarrollo de los fenómenos inflamatorios que tienen lugar en la misma.

Sin embargo, en nuestro experimento, no existía un trombo que generara un ambiente hipóxico y se observó un aumento del metabolismo anaerobio. Esto llevaría a pensar en otras dos posibilidades: que exista un estado hipóxico independiente del TIL, o que la activación del metabolismo anaerobio no esté relacionada con un estado de hipoxia en la pared del AAA.

Respecto a la primera posibilidad, en la compleja relación entre inflamación e hipoxia también se ha descrito la relación causal en sentido contrario: Campbell et al.(185) estudiaron fenómenos inflamatorios en el intestino a través de los cuales se producían estados de hipoxia local que contribuían a la adecuada resolución del cuadro inflamatorio y de la patología que lo había causado. Una reacción similar en la aorta podría explicar la activación del metabolismo anaerobio por causas hipóxicas, aunque en este caso la hipoxia generada no contribuiría a una resolución del cuadro, sino a un empeoramiento del mismo, ya que el metabolismo aerobio, como hemos visto previamente, tiene una importancia capital en el mantenimiento de la función vascular normal(31).

Oya et al(172) sometieron a macrófagos in vitro a estiramiento cíclico en condiciones de hipoxia y en condiciones de normoxia, para el estudio del efecto de estos parámetros sobre la producción de citoquinas, MMP y sobre la apoptosis de CML. En primer lugar, obtuvo medios condicionados por los macrófagos cultivados bajo estiramiento cíclico, tanto en hipoxia como en normoxia, así como un medio control. El análisis de dichos medios demostró que la expresión de MMP-9 aumentaba respecto al control únicamente en condiciones de estiramiento cíclico e hipoxia. Para la expresión de citoquinas como IL-8 y el TNF $\alpha$ , la hipoxia no tuvo efecto, aunque sí el estiramiento



## DISCUSIÓN

cíclico, que aumentaba su expresión. En segundo lugar, utilizó estos medios para cultivar CML, observando que existía una mayor apoptosis cuanto mayor era el estiramiento al que habían sido sometidos los macrófagos, pero también cuanto mayor era la hipoxia. El hecho de que la hipoxia tuviera un efecto directo sobre factores tan importantes en la fisiopatología de los AAA como la MMP-9 y la apoptosis de MCL, nos indica que indudablemente la hipoxia juega un papel importante en el desarrollo de esta patología. Sin embargo, la activación del metabolismo anaerobio no siempre es consecuencia de un estado hipóxico, y otros autores(186,187) postulan que puede existir un factor que active el metabolismo anaerobio *per se*, sin necesidad de estímulo hipóxico. De hecho, la activación del metabolismo anaerobio sólo se ha producido en aquellas muestras de tejido aórtico expuestas al MC-AAA, mientras que se han producido fenómenos inflamatorios en las muestras de tejido aórtico expuestas a todos los MC. Esta diferencia entre el estímulo inflamatorio y el cambio en el metabolismo hace menos plausible el relacionar la activación del metabolismo anaerobio con un estado hipóxico local secundario a fenómenos inflamatorios.

En relación con la alteración del metabolismo, el TIL puede jugar un papel independiente del estado hipóxico que genera en la pared. Se ha demostrado que en los segmentos aórticos en los que existe presencia de TIL existe una mayor predisposición hacia el crecimiento y la rotura aórtica(188), y se ha evidenciado un remodelamiento de la MEC con incremento de su destrucción, con disminución de la resistencia y elasticidad de la pared arterial(189,190). Estudios más recientes indican que el factor Xa de la coagulación podría estar implicado en estos fenómenos, dado que se ha observado que éste aumenta el estrés oxidativo en CML vasculares humanas(191). Además, fármacos inhibidores del FXa como el rivaroxaban han conseguido una reducción en la expresión de IL-6, moléculas relacionadas con el estrés oxidativo como NOS2, gp67-phox y gp91-

## DISCUSIÓN

phox, así como de MMP-9 in vitro. Estos hallazgos sugieren que el FXa presente en el TIL puede jugar un papel en la activación de estos mecanismos patogénicos de los AAA(86). Asimismo, se ha observado que el FXa puede producir alteraciones metabólicas consistentes en promover la interrupción del metabolismo mitocondrial aeróbico en el tejido vascular(192), produciendo una disminución de la PDH, lo que dirige el piruvato producido en la glucólisis hacia producción de lactato a través de vías anaerobias. Otros cambios metabólicos que produjo el FXa fueron un incremento de la glucólisis a través del aumento de la expresión de triosafosfatisomerasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, dos enzimas claves en esta ruta metabólica; y una disminución del ciclo de Krebs, con una reducción en la actividad de la aconitasa y un acumulo de acetil co-A dada la falta de utilización del mismo en esta ruta metabólica.

Este efecto, observado en arterias femorales de pacientes diabéticos con aterosclerosis en fase avanzada, no relacionado con la hipoxia, sino con un efecto directo de ciertas moléculas como el que ejerce FXa sobre el metabolismo, podría explicar los resultados obtenidos en nuestro experimento, en el que no ha existido hipoxia producida por trombo aórtico, dado que además las alteraciones metabólicas han sido similares: aumento de lactato sin aumento de LDH, posiblemente consecuencia de una disminución en la expresión y/o actividad de la PDH; y disminución en la actividad del ciclo de Krebs, en nuestro caso, determinada por una disminución en la actividad de la MDH. La MDH es una enzima que transforma el malato en oxalacetato, la molécula que se une con el acetil co-A para comenzar el ciclo de Krebs. Una disminución en la actividad y/o concentración de la MDH puede condicionar un bloqueo de esta ruta metabólica, por lo que no existe destino para el acetil co-A y por lo tanto sus precursores, como el piruvato, son dirigidos hacia otras rutas como la fermentación a lactato.

## DISCUSIÓN

Aunque no se ha determinado la expresión de la PDH ni su actividad, su déficit se ha observado *in vitro* en tejido aneurismático(181). El déficit de PDH es un síndrome genético de herencia ligada al cromosoma X, que se asocia a acidosis láctica severa con niveles de lactato en sangre  $>10$  mmol/L(193) a pesar de un buen estado oxémico. Los resultados obtenidos en nuestro estudio orientan a una disminución en la actividad de la PDH como causa del aumento de lactato, aunque sería necesario confirmar esta sospecha en futuros estudios.

Al igual que la fisiopatología de los AAA es desconocida en gran medida, a pesar de los avances que se están realizando en las últimas décadas, la adaptación celular a la hipoxia y los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo esta adaptación también están siendo investigados. En ellos, juega un papel central el factor inducible por hipoxia (HIF), un factor de transcripción que se compone de dos subunidades: HIF $\alpha$  y HIF $\beta$ (194). La primera subunidad es lábil y en condiciones de normoxia es hidroxilada por prolin-4-hidroxilasas (PHD), lo que conlleva su destrucción. En condiciones de hipoxia esta destrucción no se lleva a cabo y se une a HIF $\beta$ , estabilizándose e induciendo transcripción de genes diana. Los principales efectos de la activación del eje HIF $\alpha$ -PDH en el metabolismo son: aumento del consumo de glucosa, de la glucólisis y de la glucogénesis(195–197); inhibición de PDH mediante su fosforilación, con lo que se inhibe la entrada de acetil co-A al ciclo de Krebs(198); autofagia mitocondrial, limitando la capacidad respiratoria; disminución de la actividad de la cadena transportadora de electrones, con lo que se limita la producción de EROs; y aumento de transporte de protones y lactato hacia el espacio extracelular. Además, se puede inhibe la producción de oxaglutarato deshidrogenasa, enzima clave del ciclo de Krebs, lo cual provoca, una reacción anaplerótica en la cual se obtiene acetil co-A a partir de 2-oxoglutarato mediante la inversión de una parte del ciclo de Krebs. El 2-oxoglutarato se obtiene a partir de la

## DISCUSIÓN

transformación de glutamina, y el acetil co-A es utilizado para la síntesis de lípidos(199–201).

Aunque el principal estímulo para la estabilización de HIF $\alpha$  es la hipoxia, se han descrito situaciones en las que se produce estabilidad de la misma en condiciones no hipóxicas. Así, la activación de macrófagos mediante exposición al lipopolisacárido bacteriano a través del TLR-4 aumenta la concentración de HIF $\alpha$  y a través de esta ruta se producen cambios en el metabolismo de la glucosa (incrementando la concentración de enzimas glucolíticos) y se induce producción de IL-1 $\beta$ (186,187).

Un aspecto novedoso de la inducción de cambios metabólicos relacionados con hipoxia es que, en determinados grupos celulares, como células tumorales, los cambios descritos previamente pueden producirse en condiciones no hipóxicas para aumentar la síntesis de biomoléculas. Este fenómeno es conocido como efecto Warburg y mediante el bloqueo del ciclo de Krebs, de la PDH, el aumento de la glucólisis y a través de la vía de las pentosas fosfato consigue aumentar la síntesis de biomoléculas necesarias para la síntesis de DNA, lípidos y proteínas, necesarias para el crecimiento celular(202). De esta forma dirige todos los carbonos de la glucosa no hacia su oxidación a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O para obtención de ATP, sino a la biosíntesis, permitiendo un crecimiento celular rápido, sin producir EROs y obteniendo poder reductor a través de la producción de NADPH en la vía de las pentosas fosfato. Recientemente este fenómeno se ha observado en células no tumorales(203,204).

El papel del HIF $\alpha$  en los AAA es todavía muy desconocido, aunque en un estudio reciente llevado a cabo por grupo de Gäbel(205) identificaban una serie de genes que se encontraban sobreexpresados en aneurismas rotos o de gran tamaño respecto a aneurismas más pequeños, y todos ellos confluían en procesos coordinados por las vías de señalización de HIF $\alpha$ , especialmente en los fibroblastos aórticos. Además, se ha

## DISCUSIÓN

demostrado que una enzima llamada lisiloxidasa, que clásicamente cataliza las uniones cruzadas entre colágeno y elastina, puede activar HIF $\alpha$ , y este a su vez estimular la producción de lisiloxidasa, produciendo un sistema de retroalimentación positiva que estimula el crecimiento de células tumorales(206). Gäbel postula, dada la importancia de la destrucción de la MEC, que este mecanismo, independiente de la hipoxia, podría activar la vía de señalización de HIF $\alpha$  en los AAA.

Aunque en el presente estudio se han analizado pocos sustratos y enzimas, los cambios observados podrían ser compatible con este fenómeno, pudiendo estar implicados mecanismos relacionados con HIF $\alpha$  en la fisiopatología de los AAA. No obstante, para confirmar esta hipótesis, sería necesario analizar más moléculas que se ven modificadas por estos mecanismos, así como el propio HIF $\alpha$  y otros mediadores relacionados con el mismo.

Determinar la causa de los cambios metabólicos inducidos por el MC-AAA sobre el tejido aórtico sano excede los objetivos de la presente Tesis Doctoral, pero este resultado puede abrir nuevas líneas de investigación sobre las que trabajar en el futuro para comprender mejor la fisiopatología de los AAA y poder buscar dianas terapéuticas que frenen la progresión de esta enfermedad. No obstante, podemos afirmar que dichos cambios no están relacionados, al menos en su totalidad, con la hipoxia producida por el TIL sobre la pared aórtica, y que no son cambios dependientes de moléculas segregadas por plaquetas y células mononucleares, sino que son propios de la pared aórtica.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El pequeño tamaño muestral es la principal limitación del presente estudio. Este reducido tamaño muestral se explica principalmente por la complejidad de la realización de este tipo de estudios y experimentos. No obstante, y a pesar de la baja potencia estadística de la que se partía, se han producido diferencias significativas respecto al

## DISCUSIÓN

grupo control en diferentes determinaciones. También es verdad que en algunos parámetros hemos observado solamente tendencias a cambios y que probablemente debido al tamaño muestral no se alcanzó significación estadística.

Otra limitación en los experimentos desarrollados es que, aunque las moléculas que se han cuantificado se han medido en el tejido aórtico sano expuesto a los diferentes medios, tras desechar el medio condicionado y lavar los tejidos del mismo, es posible que algunas de estas moléculas no fueran sintetizadas en el propio tejido aórtico y que hubieran difundido al mismo desde el medio condicionado. Esto puede llevar a un sesgo que es inherente a una técnica, que por otro lado se ha usado ampliamente para el estudio de otras patologías, y que como se describe en la introducción, ofrece una serie de ventajas importantes sobre otro tipo de cultivos. Sin embargo, en próximos estudios realizados con medios condicionados, podría analizarse el propio medio condicionado antes de incubar el tejido aórtico, con el fin de determinar si las moléculas a estudiar ya se encontraban presentes en el medio o si han sido generadas por el tejido expuesto al mismo. Sin embargo, el hecho de la observación de la expresión de proteínas en el tejido incubado en el medio condicionado, también señala el efecto directo de los medios condicionados sobre el tejido control.

En cuanto a los cultivos en medios condicionados, lo ideal hubiera sido cultivar el tejido aórtico sano en el medio condicionado inmediatamente después de la creación del medio condicionado. Dado que la obtención de muestras de aorta sana no podía realizarse de forma programada, sino que dependía de la llegada de un donante en parada cardiorrespiratoria, era necesario congelar los medios para utilizarlos cuando hubiera disponibilidad de muestras de aorta sana.



## VIII. CONCLUSIONES





### VIII CONCLUSIONES

1. Los medios condicionados producen una respuesta inflamatoria en el tejido aórtico sano. Ésta ha sido distinta en los MC-M y MC-AAA, respecto al MC-P, donde ha tenido un carácter selectivo y específico para marcadores de inflamación crónica.
2. Los medios condicionados producen un aumento del estrés oxidativo en el tejido aórtico sano, lo que sugiere la inducción de cambios relacionados con la formación de aneurismas de aorta abdominal tras la exposición a los 3 tipos de medio condicionado.
3. Los medios condicionados producen una menor expresión de MMP-9 manteniendo la misma actividad global, lo que sugiere una modificación en la actividad por molécula de MMP-9, siendo más activas las producidas tras exposición a los medios condicionados. Esto podría interpretarse como un cambio inicial hacia el aumento de actividad en MMP-9 observado en los aneurismas de aorta abdominal, como inicio del proceso de destrucción de matriz extracelular.
4. El MC-AAA ha inducido cambios metabólicos característicos de los aneurismas de aorta abdominal, como es el incremento de lactato sin incremento de la actividad de la lactato deshidrogenasa y sin disminución en la concentración de piruvato, reflejando un viraje hacia el metabolismo anaerobio.
5. Los tres medios condicionados analizados, MC-AAA, MC-M y MC-P, producen una expresión menor de la malato deshidrogenasa, reflejando una disminución en la actividad del Ciclo de Krebs y por lo tanto, en el

## CONCLUSIONES

metabolismo aerobio, cambios característicos en la fisiopatología de los aneurismas de aorta abdominal.

6. Este aumento del metabolismo anaerobio no es atribuible a la hipoxia producida por la presencia de trombo intraluminal, dado que en nuestro experimento no existía trombo intraluminal que generara condiciones de hipoxia en el tejido estudiado.
7. Aunque los tres medios han inducido cambios característicos de los aneurismas de aorta abdominal en aorta sana, ha sido el MC-AAA el que los ha inducido de forma más completa y consistente, lo que puede sugerir que el origen principal de los procesos que conducen a la formación de los aneurismas de aorta abdominal se encontraría en la propia pared aórtica.





## IX. BIBLIOGRAFÍA



**IX BIBLIOGRAFÍA**

1. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular. *J Vasc Surg.* 1991 Mar;13(3):452–8.
2. Horejs D, Gilbert PM, Burstein S, Vogelzang RL. Normal aortoiliac diameters by CT. *J Comput Assist Tomogr.* Jan;12(4):602–3.
3. Pedersen OM, Aslaksen A, Vik-Mo H. Ultrasound measurement of the luminal diameter of the abdominal aorta and iliac arteries in patients without vascular disease. *J Vasc Surg.* 1993 Mar;17(3):596–601.
4. Li X, Zhao G, Zhang J, Duan Z, Xin S. Prevalence and trends of the abdominal aortic aneurysms epidemic in general population--a meta-analysis. *PLoS One.* 2013 Jan;8(12):e81260.
5. Bekkers SCAM, Habets JHM, Cheriex EC, Palmans A, Pinto Y, Hofstra L, et al. Abdominal aortic aneurysm screening during transthoracic echocardiography in an unselected population. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005 May;18(5):389–93.
6. Singh K, Bønaa KH, Jacobsen BK, Bjørk L, Solberg S. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study : The Tromsø Study. *Am J Epidemiol.* 2001;154(3):236–44.
7. Pleumeekers HJ, Hoes AW, van der Does E, van Urk H, Hofman A, de Jong PT, et al. Aneurysms of the abdominal aorta in older adults. The Rotterdam Study. *Am J Epidemiol.* 1995 Dec 15;142(12):1291–9.
8. Alcorn HG, Wolfson SK, Sutton-Tyrrell K, Kuller LH, O’Leary D. Risk Factors for Abdominal Aortic Aneurysms in Older Adults Enrolled in the Cardiovascular



## BIBLIOGRAFÍA

- Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Aug 1;16(8):963–70.
9. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, et al. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. *Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. Arch Intern Med.* 2000 May 22;160(10):1425–30.
  10. Svensjö S, Björck M, Gürtelschmid M, Djavani Gidlund K, Hellberg A, Wanhainen A. Low prevalence of abdominal aortic aneurysm among 65-year-old Swedish men indicates a change in the epidemiology of the disease. *Circulation.* 2011 Sep 6;124(10):1118–23.
  11. Oh SH, Chang S-A, Jang SY, Park S-J, Choi J-O, Lee S-C, et al. Routine screening for abdominal aortic aneurysm during clinical transthoracic echocardiography in a Korean population. *Echocardiography.* 2010 Nov;27(10):1182–7.
  12. Yeap BB, Hyde Z, Norman PE, Chubb SAP, Golledge J. Associations of total testosterone, sex hormone-binding globulin, calculated free testosterone, and luteinizing hormone with prevalence of abdominal aortic aneurysm in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Mar;95(3):1123–30.
  13. Adachi K, Iwasawa T, Ono T. Screening for abdominal aortic aneurysms during a basic medical checkup in residents of a Japanese rural community. *Surg Today.* 2000 Jan;30(7):594–9.
  14. Gillum RF. Epidemiology of aortic aneurysm in the United States. *J Clin Epidemiol.* 1995 Nov;48(11):1289–98.
  15. Silverberg E, Boring CC, Squires TS. Cancer statistics, 1990. *CA Cancer J Clin.* 40(1):9–26.
  16. Prevention CfDca. 20 Leading Causes of Death, United States 2000 - 2014, All

## BIBLIOGRAFÍA

- Races, Males. 2016.
17. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007 Feb 2;100(2):158–73.
  18. Sidawy AN, Sunipio BE, DePalma RG, editors. *The Basic Science of Vascular Disease. Clinical Cardiology*. Armonk, NY: Futura Publishing Company; 1997.
  19. Levy BI, Tedgui A, editors. *Biology of the Arterial Wall*. Boston, MA: Springer US; 1999.
  20. Kramer RH, Bensch KG, Davison PM, Karasek MA. Basal lamina formation by cultured microvascular endothelial cells. *J Cell Biol*. 1984 Aug;99(2):692–8.
  21. Wang CX, Shuaib A. Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Prog Neurobiol*. 2007 Oct;83(3):140–8.
  22. Schnittler HJ, Franke RP, Akbay U, Mrowietz C, Drenckhahn D. Improved in vitro rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells. *Am J Physiol*. 1993 Jul;265(1 Pt 1):C289-98.
  23. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Berndt MC. Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB Life*. 2004 Jan;56(1):13–8.
  24. Wight TN. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis*. Jan;9(1):1–20.
  25. Mecham RP, Madaras J, McDonald JA, Ryan U. Elastin production by cultured calf pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1983 Sep;116(3):282–8.
  26. Damiano V, Tsang A, Kucich U, Weinbaum G, Rosenbloom J. Immuno electron microscopic studies on cells synthesizing elastin. *Connect Tissue Res*. 1981 Jan;8(3–4):185–8.
  27. Clark JM, Glagov S. Structural integration of the arterial wall. I. Relationships and attachments of medial smooth muscle cells in normally distended and hyperdistended aortas. *Lab Invest*. 1979 May;40(5):587–602.

## BIBLIOGRAFÍA

28. Avolio A, Jones D, Tafazzoli-Shadpour M. Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertension*. 1998 Jul;32(1):170–5.
29. Dobrin PB. Distribution of lamellar deformations: implications for properties of the arterial media. *Hypertension*. 1999 Mar;33(3):806–10.
30. Wolinsky H, Glagov S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res*. 1967 Jan;20(1):99–111.
31. Vorp DA, Lee PC, Wang DH, Makaroun MS, Nemoto EM, Ogawa S, et al. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *J Vasc Surg*. 2001;34(2):291–9.
32. Fontaine V, Touat Z, Mtairag EM, Vranckx R, Louedec L, Houard X, et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol*. 2004;164(6):2077–87.
33. Cohen JR, Keegan L, Sarfati I, Danna D, Ilardi C, Wise L. Neutrophil chemotaxis and neutrophil elastase in the aortic wall in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Invest Surg*. 1991 Jan;4(4):423–30.
34. Fontaine V, Jacob M-P, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol*. 2002 Nov;161(5):1701–10.
35. Michel J-B, Martin-Ventura J-L, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res*. 2011 Apr 1;90(1):18–27.
36. Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, et al. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol*. 1990 Nov;137(5):1199–213.

## BIBLIOGRAFÍA

37. Choke E, Thompson M, Dawson J, Wilson W, Sayed S, Loftus I, et al. Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2006;26(9):2077–82.
38. Bomberger RA, Zarins CK, Taylor KE, Glagov S. Effect of hypotension on atherogenesis and aortic wall composition. *J Surg Res.* 1980 May;28(5):402–9.
39. Meyer CA, Guivier-Curien C, Moore JE. Trans-thrombus blood pressure effects in abdominal aortic aneurysms. *J Biomech Eng.* 2010 Jul;132(7):71005.
40. Müller J, Sahni O, Li X, Jansen KE, Shephard MS, Taylor CA. Anisotropic adaptive finite element method for modelling blood flow. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2005 Oct;8(5):295–305.
41. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973 Jun 29;180(4093):1332–9.
42. Pasterkamp G, Schoneveld AH, van Wolferen W, Hillen B, Clarijs RJ, Haudenschild CC, et al. The impact of atherosclerotic arterial remodeling on percentage of luminal stenosis varies widely within the arterial system. A postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Nov;17(11):3057–63.
43. Labropoulos N, Zarge J, Mansour MA, Kang SS, Baker WH. Compensatory arterial enlargement is a common pathobiologic response in early atherosclerosis. *Am J Surg.* 1998 Aug;176(2):140–3.
44. Xu C, Zarins CK, Glagov S. Aneurysmal and occlusive atherosclerosis of the human abdominal aorta. *J Vasc Surg.* 2001 Jan;33(1):91–6.
45. Reed D, Reed C, Stemmermann G, Hayashi T. Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis? *Circulation.* 1992 Jan;85(1):205–11.

## BIBLIOGRAFÍA

46. Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk Factors for Abdominal Aortic Aneurysms: A 7-Year Prospective Study: The Tromso Study, 1994-2001. *Circulation*. 2009 Apr 13;119(16):2202–8.
47. Tilson MD, Stansel HC. Differences in results for aneurysm vs occlusive disease after bifurcation grafts: results of 100 elective grafts. *Arch Surg*. 1980 Oct;115(10):1173–5.
48. Cannon DJ, Casteel L, Read RC. Abdominal aortic aneurysm, Leriche's syndrome, inguinal herniation, and smoking. *Arch Surg*. 1984 Apr;119(4):387–9.
49. Lehnert B, Wadouh F. High coincidence of inguinal hernias and abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*. 1992 Mar;6(2):134–7.
50. Antoniou GA, Georgiadis GS, Antoniou SA, Granderath FA, Giannoukas AD, Lazarides MK. Abdominal aortic aneurysm and abdominal wall hernia as manifestations of a connective tissue disorder. *J Vasc Surg*. 2011 Oct;54(4):1175–81.
51. Scherer PW. Flow in axisymmetrical glass model aneurysms. *J Biomech*. 1973 Nov;6(6):695–700.
52. Molacek J, Mares J, Treska V, Houdek K, Baxa J. Proteomic analysis of the abdominal aortic aneurysm wall. *Surg Today*. 2014;44(1):142–51.
53. Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 May;902:230-9-40.
54. Ailawadi G, Knipp BS, Lu G, Roelofs KJ, Ford JW, Hannawa KK, et al. A nonintrinsic regional basis for increased infrarenal aortic MMP-9 expression and activity. *J Vasc Surg*. 2003 May;37(5):1059–66.
55. Dobrin PB. Pathophysiology and pathogenesis of aortic aneurysms. *Current*

## BIBLIOGRAFÍA

- concepts. *Surg Clin North Am.* 1989 Aug;69(4):687–703.
56. Newman DL, Gosling RG, King DH, Bowden NL. Pressure amplitude increase on unmatching the aortic-iliac junction of the dog. *Cardiovasc Res.* 1973 Jan;7(1):6–13.
57. Wolinsky H, Glagov S. Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. Deviation of man from the usual pattern. *Circ Res.* 1969 Dec;25(6):677–86.
58. Wasserman SM, Mehraban F, Komuves LG, Yang R-B, Tomlinson JE, Zhang Y, et al. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. *Physiol Genomics.* 2002 Dec 26;12(1):13–23.
59. Topper JN, Gimbrone MA. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today.* 1999 Jan;5(1):40–6.
60. McCormick ML, Gavrila D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Mar;27(3):461–9.
61. Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Ramey WG, Tilson MD. Cytokines that activate proteolysis are increased in abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 1994. p. II224-7.
62. Hamano K, Li T-S, Takahashi M, Kobayashi T, Shirasawa B, Ito H, et al. Enhanced tumor necrosis factor-  $\alpha$  expression in small sized abdominal aortic aneurysms. *World J Surg.* 2003 Apr;27(4):476–80.
63. Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* Jan;99(1):96–104.

## BIBLIOGRAFÍA

64. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1309–12.
65. Durdu S, Deniz GC, Balci D, Zaim C, Dogan A, Can A, et al. Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cell Depletion via BCL2 Family of Proteins in Human Ascending Aortic Aneurysm and Dissection. *Cardiovasc Ther*. 2012 Dec;30(6):308–16.
66. Petrinec D, Liao S, Holmes DR, Reilly JM, Parks WC, Thompson RW. Doxycycline inhibition of aneurysmal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kD gelatinase. *J Vasc Surg*. 1996 Feb;23(2):336–46.
67. Saratzis A, Abbas AA, Kiskinis D, Melas N, Saratzis N, Kitas GD. Abdominal aortic aneurysm: a review of the genetic basis. *Angiology*. 2011 Jan;62(1):18–32.
68. Simmers P, Gishto A, Vyavahare N, Kothapalli CR. Nitric Oxide Stimulates Matrix Synthesis and Deposition by Adult Human Aortic Smooth Muscle Cells Within Three-Dimensional Cocultures. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(7–8):1455–70.
69. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiology*. 2013 Nov 1;28(6):391–403.
70. Tan KT, Watson SP, Lip GYH. The endothelium and platelets in cardiovascular disease: potential targets for therapeutic intervention. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2004 Apr;2(2):169–78.
71. McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH. Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation*. 1997 Oct 7;96(7):2228–32.
72. Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, et al.

## BIBLIOGRAFÍA

- Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest.* 1995 Jul;96(1):318–26.
73. Lindholt JS, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW, Heickendorff L. The plasma level of matrix metalloproteinase 9 may predict the natural history of small abdominal aortic aneurysms. A preliminary study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000;20(3):281–5.
74. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2002 Sep;110(5):625–32.
75. Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 7;1477(1–2):267–83.
76. Murphy G, Knäuper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the “hemopexin” domain? *Matrix Biol.* 1997 Mar;15(8–9):511–8.
77. Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res.* 1998 Sep;8(3):179–86.
78. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem.* 1992 Mar 5;267(7):4583–91.
79. DeLeo FR, Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol.* 1996 Dec;60(6):677–91.
80. Jendrossek V, Ritzel A, Neubauer B, Heyden S, Gahr M. An in-frame triplet deletion within the gp91-phox gene in an adult X-linked chronic granulomatous



## BIBLIOGRAFÍA

- disease patient with residual NADPH-oxidase activity. *Eur J Haematol*. 1997 Feb;58(2):78–85.
81. Li WG, Miller FJ, Zhang HJ, Spitz DR, Oberley LW, Weintraub NL. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced O<sub>2</sub> production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2001 Aug 3;276(31):29251–6.
82. Guzik B, Sagan A, Ludew D, Mrowiecki W, Chwała M, Bujak-Gizycka B, et al. Mechanisms of oxidative stress in human aortic aneurysms — Association with clinical risk factors for atherosclerosis and disease severity. *Int J Cardiol*. 2013 Oct 3;168(3):2389–96.
83. Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept*. 2000 Jun 30;90(1–3):19–25.
84. Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, et al. Mechanical Stretch Enhances mRNA Expression and Proenzyme Release of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H Oxidase–Derived Reactive Oxygen Species. *Circ Res*. 2003;92(11).
85. Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF- $\kappa$ B and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation*. 1997 Oct 7;96(7):2361–7.
86. Moñux G, Zamorano-León JJ, Marqués P, Sopena B, García-García JM, Laich de Koller G, et al. FXa inhibition by Rivaroxaban modifies mechanisms associated with the pathogenesis of human abdominal aortic aneurysms. *Br J Clin Pharmacol*.

## BIBLIOGRAFÍA

- 2017 Jul 23;83(12):2661–70.
87. Keen RR, Nolan KD, Cipollone M, Scott E, Shively VP, Yao JS, et al. Interleukin-1 beta induces differential gene expression in aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 1994 Nov;20(5):774-84-6.
  88. Alexander JP, Samples JR, Acott TS. Growth factor and cytokine modulation of trabecular meshwork matrix metalloproteinase and TIMP expression. *Curr Eye Res.* 1998;17(3):276–85.
  89. Middleton RK, Lloyd GM, Bown MJ, Cooper NJ, London NJ, Sayers RD. The pro-inflammatory and chemotactic cytokine microenvironment of the abdominal aortic aneurysm wall: a protein array study. *J Vasc Surg.* 2007;45(3):574–80.
  90. Schönbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P. T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol.* 2002 Aug;161(2):499–506.
  91. Davis VA, Persidskaia RN, Baca-Regen LM, Fiotti N, Halloran BG, Baxter BT. Cytokine pattern in aneurysmal and occlusive disease of the aorta. *J Surg Res.* 2001 Dec;101(2):152–6.
  92. Baxter BT, McGee GS, Flinn WR, McCarthy WJ, Pearce WH, Yao JS. Distal embolization as a presenting symptom of aortic aneurysms. *Am J Surg.* 1990 Aug;160(2):197–201.
  93. Marston WA, Ahlquist R, Johnson G, Meyer AA, Crawford E, Saleh S, et al. Misdiagnosis of ruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg. Elsevier;* 1992 Jul;16(1):17–22.
  94. Khaw H, Sottiurai VS, Craighead CC, Batson RC, Dubost C, Allary M, et al. Ruptured abdominal aortic aneurysm presenting as symptomatic inguinal mass: Report of six cases. *J Vasc Surg. Elsevier;* 1986 Oct;4(4):384–9.

## BIBLIOGRAFÍA

95. Hallin A, Bergqvist D, Holmberg L, Participants TUKSAT, Katz D, Littenberg B, et al. Literature Review of Surgical Management of Abdominal Aortic Aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Elsevier; 2001 Sep;22(3):197–204.
96. Lindholt J., Heegaard NH., Vammen S, Fasting H, Henneberg E., Heickendorff L, et al. Smoking, but not Lipids, Lipoprotein (a) and Antibodies Against Oxidised LDL, is Correlated to the Expansion of Abdominal Aortic Aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Elsevier; 2001 Jan;21(1):51–6.
97. Chang JB, Stein TA, Liu JP, Dunn ME, Ernst C, Trotter M, et al. Risk factors associated with rapid growth of small abdominal aortic aneurysms. *Surgery*. Elsevier; 1997 Feb;121(2):117–22.
98. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Littooy FN, Bandyk D, et al. Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann Intern Med*. 1997 Mar 15;126(6):441–9.
99. Karrowni W, Dughman S, Hajj GP, Miller FJ. Statin therapy reduces growth of abdominal aortic aneurysms. *J Investig Med*. 2011 Dec;59(8):1239–43.
100. Schlösser FJV, Tangelder MJD, Verhagen HJM, van der Heijden GJMG, Muhs BE, van der Graaf Y, et al. Growth predictors and prognosis of small abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. Elsevier; 2008 Jun;47(6):1127–33.
101. Schouten O, van Laanen JHH, Boersma E, Vidakovic R, Feringa HHH, Dunkelgrün M, et al. Statins are Associated with a Reduced Infrarenal Abdominal Aortic Aneurysm Growth. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Elsevier; 2006 Jul;32(1):21–6.
102. Sukhija R, Aronow WS, Sandhu R, Kakar P, Babu S, Kertai MD, et al. Mortality and size of abdominal aortic aneurysm at long-term follow-up of patients not

## BIBLIOGRAFÍA

- treated surgically and treated with and without statins. *Am J Cardiol.* Elsevier; 2006 Jan 15;97(2):279–80.
103. Yoshimura K, Nagasawa A, Kudo J, Onoda M, Morikage N, Furutani A, et al. Inhibitory effect of statins on inflammation-related pathways in human abdominal aortic aneurysm tissue. *Int J Mol Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2015;16(5):11213–28.
104. Ferguson CD, Clancy P, Bourke B, Walker PJ, Dear A, Buckenham T, et al. Association of statin prescription with small abdominal aortic aneurysm progression.
105. Heikkinen M, Salenius J-P, Auvinen O. Ruptured abdominal aortic aneurysm in a well-defined geographic area. *J Vasc Surg.* Elsevier; 2002 Aug;36(2):291–6.
106. Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW, Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS, et al. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms: Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg.* Elsevier; 2003 May;37(5):1106–17.
107. Foster JH, Bolasny BL, Gobbel WG, Scott HW. Comparative study of elective resection and expectant treatment of abdominal aortic aneurysm. *Surg Gynecol Obstet.* 1969 Jul;129(1):1–9.
108. Conway KP, Byrne J, Townsend M, Lane IF, Participants TUSAT, Darling R, et al. Prognosis of patients turned down for conventional abdominal aortic aneurysm repair in the endovascular and sonographic era: Szilagyi revisited? *J Vasc Surg.* Elsevier; 2001 Apr;33(4):752–7.
109. Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, et al. Management of Abdominal Aortic Aneurysms Clinical Practice Guidelines of the

## BIBLIOGRAFÍA

- European Society for Vascular Surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Elsevier; 2011 Jan;41:S1–58.
110. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg*. 1999 Sep;230(3):289-96-7.
111. Stenbaek J, Kalin B, Swedenborg J, Stillwell G, Hollier L, Taylor L, et al. Growth of Thrombus may be a Better Predictor of Rupture than Diameter in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Elsevier; 2000 Nov;20(5):466–9.
112. Stringfellow MM, Lawrence PF, Stringfellow RG. The influence of aorta-aneurysm geometry upon stress in the aneurysm wall. *J Surg Res*. 1987 Apr;42(4):425–33.
113. Mower WR, Baraff LJ, Sneyd J. Stress Distributions in Vascular Aneurysms: Factors Affecting Risk of Aneurysm Rupture. *J Surg Res*. Elsevier; 1993 Aug;55(2):155–61.
114. Inzoli F, Boschetti F, Zappa M, Longo T, Fumero R. Biomechanical factors in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Surg*. 1993 Nov;7(6):667–74.
115. Lederle FA, Walker JM, Reinke DB, Statistics NC for H, Darling RC BD, Whittemore AD CAHH et al, et al. Selective Screening for Abdominal Aortic Aneurysms With Physical Examination and Ultrasound. *Arch Intern Med*. American Medical Association; 1988 Aug 1;148(8):1753.
116. Lederle FA, Simel DL. The rational clinical examination. Does this patient have abdominal aortic aneurysm? . *JAMA*. 1999 Jan 6;281(1):77–82.
117. Shuman WP, Hastrup W, Kohler TR, Nyberg DA, Wang KY, Vincent LM, et al. Suspected leaking abdominal aortic aneurysm: use of sonography in the

## BIBLIOGRAFÍA

- emergency room. *Radiology*. 1988 Jul;168(1):117–9.
118. Pavone P, Di Cesare E, Di Renzi P, Marsili L, Ventura M, Spartera C, et al. Abdominal aortic aneurysm evaluation: comparison of US, CT, MRI, and angiography. *Magn Reson Imaging*. 1990;8(3):199–204.
119. Jaakkola P, Hippeläinen M, Farin P, Rytönen H, Kainulainen S, Partanen K. Interobserver variability in measuring the dimensions of the abdominal aorta: comparison of ultrasound and computed tomography. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1996 Aug;12(2):230–7.
120. Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, et al. Variability in measurement of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. Elsevier; 1995 Jun;21(6):945–52.
121. Thomas PR, Shaw JC, Ashton HA, Kay DN, Scott RA. Accuracy of ultrasound in a screening programme for abdominal aortic aneurysms. *J Med Screen*. 1994 Jan;1(1):3–6.
122. Sprouse LR, Meier GH, LeSar CJ, DeMasi RJ, Sood J, Parent FN, et al. Comparison of abdominal aortic aneurysm diameter measurements obtained with ultrasound and computed tomography: is there a difference? *J Vasc Surg*. Elsevier; 2003 Sep;38(3):466–71.
123. Wyers MC, Fillinger MF, Schermerhorn ML, Powell RJ, Rzucidlo EM, Walsh DB, et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysm without preoperative arteriography. *J Vasc Surg*. Elsevier; 2003 Oct;38(4):730–8.
124. Balm R, Eikelboom BC, van Leeuwen MS, Noordzij J. Spiral CT-angiography of the aorta. *Eur J Vasc Surg*. 1994 Sep;8(5):544–51.
125. Brown PM, Pattenden R, Vernooy C, Zelt DT, Gutelius JR, Brown P, et al. Selective management of abdominal aortic aneurysms in a prospective

## BIBLIOGRAFÍA

- measurement program. *J Vasc Surg. Elsevier*; 1996 Feb;23(2):213–22.
126. Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, et al. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med*. 2002 May 9;346(19):1437–44.
127. Manfredini R, Portaluppi F, Grandi E, Fersini C, Gallerani M, Budd J, et al. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. *Lancet. Elsevier*; 1998 Nov;352(9141):1649–55.
128. Greenhalgh RM, Powell JT. Screening men for aortic aneurysm. *BMJ*. 2002 Nov 16;325(7373):1123–4.
129. Chaikof EL, Brewster DC, Dalman RL, Makaroun MS, Illig KA, Sicard GA, et al. The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: The Society for Vascular Surgery practice guidelines. *J Vasc Surg. Elsevier*; 2009 Oct;50(4):S2–49.
130. Fillinger MF, Racusin J, Baker RK, Cronenwett JL, Teutelink A, Schermerhorn ML, et al. Anatomic characteristics of ruptured abdominal aortic aneurysm on conventional CT scans: implications for rupture risk. *J Vasc Surg. Elsevier*; 2004 Jun;39(6):1243–52.
131. Nowygrod R, Egorova N, Greco G, Anderson P, Gelijns A, Moskowitz A, et al. Trends, complications, and mortality in peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg. Elsevier*; 2006 Feb;43(2):205–16.
132. Takagi H, Umemoto T, ALICE (All-Literature Investigation of Cardiovascular Evidence) Group PW, Sidloff D, Dattani N, Choke E, et al. A meta-analysis pooling survival curves in randomized controlled trials and propensity-score matched studies of endovascular versus open abdominal aortic aneurysm repair. *Int J Cardiol. Elsevier*; 2014 Jul 1;174(3):785–8.

## BIBLIOGRAFÍA

133. Revuelta Suero S, Martínez-López I, Hernández Mateo MM, Cernuda Artero I, Marqués de Marino P, Cabrero Fernández M, et al. Resultados de la reparación de 1000 AAA en la era endovascular. In: Congreso Nacional de la SEACV. Castellón; 2015.
134. Jain NC. A scanning electron microscopic study of platelets of certain animal species. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975 Jun 30;33(3):501–7.
135. Paulus JM. Platelet size in man. *Blood*. 1975 Sep;46(3):321–36.
136. Yip J, Shen Y, Berndt MC, Andrews RK. Primary platelet adhesion receptors. *IUBMB Life*. 2005 Feb;57(2):103–8.
137. Siljander PR-M, Munnix ICA, Smethurst PA, Deckmyn H, Lindhout T, Ouwehand WH, et al. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1333–41.
138. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2096–104.
139. Del Conde I, Cruz MA, Zhang H, López JA, Afshar-Kharghan V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J Exp Med*. 2005 Mar 21;201(6):871–9.
140. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Española Cardiol Supl. Elsevier*; 2013 Jan;13(Supl.B):2–7.
141. Pepper DS. Macromolecules released from platelet storage organelles. *Thromb Haemost*. 1980 Feb 29;42(5):1667–72.
142. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009 Feb;7(2):241–



## BIBLIOGRAFÍA

- 6.
143. Yeaman MR. Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Feb;67(4):525–44.
144. Yeaman MR, Norman DC, Bayer AS. Platelet microbicidal protein enhances antibiotic-induced killing of and postantibiotic effect in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 Aug;36(8):1665–70.
145. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, et al. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation.* 1997 Sep 16;96(6):1809–18.
146. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha(v)beta3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med.* 1998 Feb 2;187(3):329–39.
147. Johnson RC, Mayadas TN, Frenette PS, Mebius RE, Subramaniam M, Lacasce A, et al. Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood.* 1995 Aug 1;86(3):1106–14.
148. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 1;92(16):7450–4.
149. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood.* 1998 Feb 15;91(4):1318–24.
150. Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production.

## BIBLIOGRAFÍA

- J Exp Med. 1991 Oct 1;174(4):785–90.
151. Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, et al. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood*. 1994 Dec 15;84(12):4242–8.
  152. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, et al. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*. Elsevier; 2000 Jan;148(1):75–85.
  153. Modrego J, Moñux G, Mateos-Cáceres PJ, Martínez-López I, Segura A, Zamorano-León JJ, et al. Effects of platelets on the protein expression in aortic segments: A proteomic approach. *J Cell Biochem*. 2010;111(4):889–98.
  154. Springer TA, Anderson DC, Springer TA, Arfors K-E, Lundberg C, Lindborm L, et al. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*. Elsevier; 1994 Jan;76(2):301–14.
  155. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
  156. von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, et al. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*. 2001 Apr 3;103(13):1772–7.
  157. Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ, et al. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation*. 2002 Sep 17;106(12):1523–9.
  158. Danese S, de la Motte C, Reyes BMR, Sans M, Levine AD, Fiocchi C. Cutting

## BIBLIOGRAFÍA

- edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2011–5.
159. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol.* 1996 May 15;156(10):3952–60.
160. Pearce WH, Sweis I, Yao JS, McCarthy WJ, Koch AE. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release in normal and diseased human infrarenal aortas. *J Vasc Surg.* 1992 Nov;16(5):784–9.
161. Yokoo T, Kitamura M. Dual regulation of IL-1 beta-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF-kappa B and AP-1. *Am J Physiol.* 1996 Jan;270(1 Pt 2):F123-30.
162. Liang K-C, Lee C-W, Lin W-N, Lin C-C, Wu C-B, Luo S-F, et al. Interleukin-1beta induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 2007 Jun;211(3):759–70.
163. Mathews CK, van Holde K, Ahern KG. Bioquímica. 3ª Edición. Madrid: Pearson Educación, SA; 2003.
164. PACE DM, AFTONOMOS L. Effects of cell density on cell growth in a clone of mouse liver cells. *J Natl Cancer Inst.* 1957 Dec;19(6):1065–75.
165. Takahashi K, Okada TS. An analysis of the effect of “Conditioned Medium ” upon the cell culture at low density. 1970;2(2):65–77.
166. Minion DJ, Wang Y, Lynch TG, Fox IJ, Prorok GD, Baxter BT. Soluble factors modulate changes in collagen gene expression in abdominal aortic aneurysms. *Surgery.* 1993 Aug;114(2):252-6-7.

## BIBLIOGRAFÍA

167. Szekanecz Z, Shah MR, Harlow LA, Pearce WH, Koch AE. Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are involved in human aortic endothelial cell migration. The possible role of these cytokines in human aortic aneurysmal blood vessel growth. *Pathobiology*. 1994 Jan;62(3):134–9.
168. Walton LJ, Franklin IJ, Bayston T, Brown LC, Greenhalgh RM, Taylor GW, et al. Inhibition of Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthesis in Abdominal Aortic Aneurysm. *Circulation*. 1999;100:48–55.
169. Liao S, Curci JA, Kelley BJ, Sicard GA, Thompson RW. Accelerated Replicative Senescence of Medial Smooth Muscle Cells Derived from Abdominal Aortic Aneurysms Compared to the Adjacent Inferior Mesenteric Artery 1. 2000;95:85–95.
170. Liu J, Xiong W, Baca-Regen L, Nagase H, Baxter BT. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. 2003;38:1376–83.
171. Houard X, Touat Z, Ollivier V, Louedec L, Philippe M, Sebbag U, et al. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res*. 2009;82(3):532–41.
172. Oya K, Sakamoto N, Sato M. Biochemical and Biophysical Research Communications Combined stimulation with cyclic stretching and hypoxia increases production of matrix metalloproteinase-9 and cytokines by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. Elsevier Inc.; 2011;412(4):678–82.
173. Blomkalns AL, Gavrilu D, Thomas M, Neltner BS, Blanco VM, Benjamin SB, et al. CD14 Directs Adventitial Macrophage Precursor Recruitment: Role in Early Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(2):e000065–e000065.

## BIBLIOGRAFÍA

174. Biros E, Moran CS, Walker PJ, Cardinal J, Golledge J. A deletion in chromosome 6q is associated with human abdominal aortic aneurysm. 2014;484:475–84.
175. Guedj K, Khallou-Laschet J, Clement M, Morvan M, Delbosc S, Gaston A-T, et al. Inflammatory micro-environmental cues of human atherothrombotic arteries confer to vascular smooth muscle cells the capacity to trigger lymphoid neogenesis. PLoS One. 2014;9(12):e116295.
176. Rubio-navarro A, Manuel J, Villalobos A, Lindholt JS, Buendía I, Egido J, et al. Hemoglobin induces monocyte recruitment and CD163-macrophage polarization in abdominal aortic aneurysm ☆. Int J Cardiol. Elsevier Ireland Ltd; 2015;201:66–78.
177. Bain BJ. Blood cells: A practical guide. 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2002.
178. López-Farré A, Bernabeu F, Gómez-Garre D, Ramon y Cajal S, Braquet P, López-Nova JM. Platelet-activating factor antagonists treatment protects against postischemic acute renal failure in rats. J Pharmacol Exp Ther. 1990 Apr;253(1):328–33.
179. Aukrust P, Müller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. Circulation. 1999 Aug 10;100(6):614–20.
180. Touat Z, Ollivier V, Dai J, Huisse M-G, Bezeaud A, Sebbag U, et al. Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution. Am J Pathol. 2006 Mar;168(3):1022–30.
181. Modrego J, López-Farré AJ, Martínez-López I, Muela M, Macaya C, Serrano J, et

## BIBLIOGRAFÍA

- al. Expression of cytoskeleton and energetic metabolism-related proteins at human abdominal aortic aneurysm sites. *J Vasc Surg.* Elsevier Inc.; 2012;55(4):1124–33.
182. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. Schwartz RS, editor. *N Engl J Med.* 2011 Feb 17;364(7):656–65.
183. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release. *Am J Physiol.* 1995 Jul;269(1 Pt 2):R160-6.
184. Albina JE, Henry WL, Mastrofrancesco B, Martin BA, Reichner JS. Macrophage activation by culture in an anoxic environment. *J Immunol.* 1995 Nov 1;155(9):4391–6.
185. Campbell EL, Bruyninckx WJ, Kelly CJ, Glover LE, McNamee EN, Bowers BE, et al. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity.* 2014 Jan 16;40(1):66–77.
186. Blouin CC, Pagé EL, Soucy GM, Richard DE. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Blood.* 2004 Feb 1;103(3):1124–30.
187. Palsson-McDermott EM, Curtis AM, Goel G, Lauterbach MAR, Sheedy FJ, Gleeson LE, et al. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 $\alpha$  activity and IL-1 $\beta$  induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab.* 2015 Jan 6;21(1):65–80.
188. Koole D, Zandvoort HJA, Schoneveld A, Vink A, Vos JA, van den Hoogen LL, et al. Intraluminal abdominal aortic aneurysm thrombus is associated with disruption of wall integrity. *J Vasc Surg.* 2013 Jan;57(1):77–83.
189. Kazi M, Thyberg J, Religa P, Roy J, Eriksson P, Hedin U, et al. Influence of

## BIBLIOGRAFÍA

- intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg*. 2003 Dec;38(6):1283–92.
190. Vorp DA, Vande Geest JP. Biomechanical Determinants of Abdominal Aortic Aneurysm Rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 May 19;25(8):1558–66.
191. Jobi K, Rauch BH, Dangwal S, Freidel K, Doller A, Eberhardt W, et al. Redox regulation of human protease-activated receptor-2 by activated factor X. *Free Radic Biol Med*. 2011 Nov 1;51(9):1758–64.
192. López-Farré AJ, Rodríguez-Sierra P, Modrego J, Segura A, Martín-Palacios N, Saiz AM, et al. Effects of factor Xa on the expression of proteins in femoral arteries from type 2 diabetic patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Dec;78(6):1366–77.
193. Brown GK, Otero LJ, LeGris M, Brown RM. Pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Med Genet*. 1994;31(11):875–9.
194. Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):393–402.
195. Sadiku P, Willson JA, Dickinson RS, Murphy F, Harris AJ, Lewis A, et al. Prolyl hydroxylase 2 inactivation enhances glycogen storage and promotes excessive neutrophilic responses. *J Clin Invest*. 2017 Sep 1;127(9):3407–20.
196. Favaro E, Bensaad K, Chong MG, Tennant DA, Ferguson DJP, Snell C, et al. Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells. *Cell Metab*. 2012 Dec 5;16(6):751–64.
197. Zois CE, Harris AL. Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *J Mol Med (Berl)*. 2016 Feb 17;94(2):137–54.
198. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest*. 2013 Sep 3;123(9):3664–71.

## BIBLIOGRAFÍA

199. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*. 2011 Nov 20;481(7381):380–4.
200. Wise DR, Ward PS, Shay JES, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, et al. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 6;108(49):19611–6.
201. Gameiro PA, Yang J, Metelo AM, Pérez-Carro R, Baker R, Wang Z, et al. In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation. *Cell Metab*. 2013 Mar 5;17(3):372–85.
202. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029–33.
203. Redel BK, Brown AN, Spate LD, Whitworth KM, Green JA, Prather RS. Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the Warburg Effect. *Mol Reprod Dev*. 2012 Apr;79(4):262–71.
204. Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):297–308.
205. Gäbel G, Northoff BH, Weinzierl I, Ludwig S, Hinterseher I, Wilfert W, et al. Molecular Fingerprint for Terminal Abdominal Aortic Aneurysm Disease. *J Am Heart Assoc*. 2017 Dec 30;6(12):e006798.
206. Pez F, Dayan F, Durivault J, Kaniewski B, Aimond G, Le Provost GS, et al. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth. *Cancer*



## BIBLIOGRAFÍA

Res. 2011 Mar 1;71(5):1647–57.



